

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Simulación y control de biofilms portadores de "Listeria
monocytogenes" en la industria alimentaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Carmen Hernández Puga

Directoras

**Carmen San José Serrán
Belén Orgaz Martín**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



SIMULACIÓN Y CONTROL DE BIOFILMS PORTADORES DE
***Listeria monocytogenes* EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Hernández Puga

Bajo la dirección de:

Carmen San José Serrán

Belén Orgaz Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

CARMEN SAN JOSÉ SERRÁN CATEDRÁTICA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS Y **BELÉN ORGAZ MARTÍN** PROFESORA CONTRATADA DOCTORA, AMBAS PERTENCECIENTES AL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Simulación y control de biofilms portadores de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria**”, de la que es autora la Licenciada Carmen Hernández Puga, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 23 de Octubre 2015

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Carmen San José Serrán

Belén Orgaz Martín

*No podemos avanzar en el conocimiento de
algo si no nos mueve el amor; ni tampoco
amar algo en lo que no vemos racionalidad*

Benedicto XVI

Ad Maiorem Dei Gloriam

Ha llegado el momento de terminar esta aventura, finalizar el doctorado, etapa de mi vida en la que con esfuerzo y trabajo, pero también con ayuda insustituible, he sido capaz llevar a término esta tesis.

Gracias en primer lugar a la Universidad Complutense de Madrid, por concederme la beca predoctoral con la que realizar estos estudios, así como la formación académica que me ha permitido llegar hasta aquí, en las facultades de Medicina y Veterinaria.

Gracias a las directoras de esta tesis, la Prof. Dra. Carmen San José Serrán y la Dra. Belén Orgaz Martín, por contribuir generosamente con su trabajo y dedicación, sus conocimientos y su valioso ejemplo a mi formación. Gracias Carmen, por tus buenos y experimentados consejos, por tu inestimable confianza en mí y por darme la oportunidad de iniciar mi carrera científica formando parte de este grupo de investigación. Gracias Belén, por acompañarme tan de cerca en todo este tiempo, por guiar mis pasos en este camino y por enseñarme la importancia de hacer bien las cosas.

Gracias al Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. A la Dra. M^a Dolores Selgas Cortecero, su directora, y al resto de profesores por su acogida y por su colaboración siempre que la necesité.

A las personas con las que he compartido tantos momentos en el laboratorio durante todos estos años. A José, Doris y María, quienes junto a Belén, me recibieron y ayudaron nada más llegar y me enseñaron a trabajar con los biofilms. Gracias a todos los alumnos que han pasado por el laboratorio, contribuyendo con su trabajo a esta tesis. Muy especialmente a Laura, con la que he compartido gran parte de este tiempo. Por tu destacable y eficiente ayuda, por hacer más amenos los días de intenso trabajo y por tu amistad. También, en esta última parte, gracias a Sandra, por su trabajo y buen carácter. A Xavi, compañero de fatigas en este camino, por compartir los buenos y malos momentos. Gracias por estar ahí.

Gracias a todos los demás, que de algún modo u otro habéis compartido este tiempo conmigo. A Rosa, Ana, Karen, Lola, Carlos y Conchita por vuestro cariño y cercanía. A mis compañeros de la planta de arriba, por su ayuda y disponibilidad, especialmente al grupo de Juan Miguel, por las veces que me han ayudado a resolver una emergencia. En el comedor gracias también a Eva, Carmen Herranz, Juan Miguel, Esther, Susana, Rebeca, Virginia, Nivia, Laura, Irene y Javi, por hacer que la comida fuera más familiar. Por último gracias al personal no docente, a Alberto por su ayuda con la informática, a Aurora por su cariño y disponibilidad, a Andrés y Santiago por su amabilidad y atención.

Gracias al Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM, por el apoyo técnico aportado a los trabajos de esta tesis, a Juanjo, Luis, Carlos y especialmente a Alfonso, por acercarme con sencillez a los conocimientos sobre la microscopía confocal.

Gracias a mi insustituible y fiel familia, y a mis amigos, por ser el gran apoyo en el que me he sostenido estos años. Gracias a mis padres, por su infinita entrega, cuidado y dedicación. Por mostrarme el valor del esfuerzo y el sacrificio. Gracias a mis hermanos, Jesús y Laura, por abrirme el paso en tantas cosas, haciendo

todo más fácil y por ser un modelo para mí. Gracias a Pureza y Miguel Ángel por atender y cuidar con tanto cariño y esmero a Carmen María en este último año de tanto trabajo. Gracias a todos mis amigos a los que tantas veces he pedido ayuda en los momentos en los que alcanzar esta meta parecía complicado. Gracias por todas vuestras oraciones.

Gracias Javi por ayudarme y apoyarme incondicionalmente, por entender este trabajo y animarme en los momentos difíciles. Gracias por hacerme ser mejor. Y gracias a ti Carmen María, porque cada día me recuerdas que la Vida es mucho más.

Y gracias a Dios, que a través de vosotros me cuida y me guía, y que da un sentido a mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	5
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. BIOFILMS	15
1.1 Concepto	15
1.2 Matriz	18
1.2.1 Composición de la matriz	19
1.2.2 Propiedades de la matriz	26
1.2.3 Funciones de la matriz	28
1.3 Formación	29
1.3.1 Adhesión reversible	30
1.3.2 Adhesión irreversible	32
1.3.3 Maduración	33
1.3.4 Desprendimiento	34
1.3.5 Heterogeneidad de la comunidad adherida	35
1.4 Estructura	35
1.4.1 Consecuencias de la estructura	36
1.4.2 Factores que influyen en la estructura	38
1.4.3 Algunas excepciones. El caso de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
1.4.4 Otros aspectos de la estructura	40
1.5 Regulación. Comunicación dentro del biofilm.	40
1.5.1 <i>Quorum sensing</i> . El lenguaje de las bacterias	40
1.5.2 Otros sistemas de regulación	44
2. BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	44
2.1 Impacto de los biofilms en la industria alimentaria	44
2.2 La industria alimentaria: un lugar privilegiado para la formación de biofilms	45
2.3 Instalaciones de la industria alimentaria	46
2.3.1 Equipos presentes en la industria alimentaria	47
2.3.2 Superficies abiertas	49
2.3.3 Materiales en la industria alimentaria	50

2.4 Microbiota presente en la industria alimentaria	52
2.4.1 Patógenos implicados	53
2.4.2 El caso de <i>Listeria monocytogenes</i>	53
2.4.3 Interacciones ecológicas. Amigos y enemigos	55
2.5 Situaciones de estrés. La paradoja	60
2.5.1 Adaptación a la limpieza y desinfección rutinarias	60
2.5.2 El fenómeno de la persistencia. Persistencia y persistores	64
2.5.3 Las bajas temperaturas	67
3. CONTROL DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	71
3.1 Estrategias de prevención	72
3.1.1 Monitorización	72
3.1.2 Modelos matemáticos	74
3.1.3 Materiales funcionales. Revestimientos	74
3.1.4 Biocontrol	75
3.2 Estrategias de eliminación	76
3.2.1 Limpieza	76
3.2.2 Desinfección	77
3.2.3 Estrategias alternativas	80
3.2.3.1 Enzimas	80
3.2.3.2 Quitosano	81
3.2.3.3 Bacteriófagos	84
3.2.3.4 Inhibidores de los sistemas de comunicación <i>quorum sensing</i>	85
3.2.3.5 Miscelánea	86

CAPÍTULO I: Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms **89**

1. Abstract	91
2. Introduction	92
3. Materials and methods	93
3.1 Bacterial strains	93
3.2 Experimental system	93
3.3 Cell recovery and counting	94
3.4 Biomass determination	94
3.5 Apparent attached-cell generation times	94
3.6 Statistical analysis	95
3.7 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	95

4. Results	95
4.1 Counts in planktonic phase and biofilms from monospecies and dual-species cultures	95
4.2 CLSM images of biofilms with <i>Pf</i> and <i>Listeria</i>	97
5. Discussion	101
5.1 Outcome of the interaction between <i>Pf</i> and <i>Lm</i> Scott A on the planktonic and biofilm of dual cultures	101
5.2 EPS and layering in dual biofilms	102
5.3 Is pseudomonas a primary surface colonizer needed for <i>Lm</i> attachment?	103
5.4 Dual biofilms at low temperatures	103
6. Acknowledgments	104
7. References	104

CAPÍTULO II: *Listeria monocytogenes* redesign of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Structural layouts at different development stages at 4 and 20°C

1. Abstract	111
2. Introduction	112
3. Materials and methods	113
3.1 Bacterial strains	113
3.2 Experimental system	113
3.3 Cell recovery and counting	114
3.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	114
3.5 Biomass determination	114
4. Results	115
4.1 Effects of <i>L. monocytogenes</i> co-culture on <i>P. fluorescens</i> 's biofilms at 20°C	115
4.2 Effects of <i>L. monocytogenes</i> co-culture on <i>P. fluorescens</i> 's biofilms at 4°C	116
4.3 Aeration vs. mono and dual-species <i>P. fluorescens</i> 's biofilms development	116
5. Discussion	117
6. Acknowledgments	119
7. Tables and figures	119
8. References	124

CAPÍTULO III: Cold stress and presence of *Pseudomonas fluorescens* affect *Listeria monocytogenes* biofilm structure and response to chitosan

129

1. Abstract	131
2. Introduction	132
3. Materials and methods	133
3.1 Bacterial strains	133
3.2 Experimental system	132
3.3 Antimicrobial testing	134
3.4 Cell recovery and counting	134
3.5 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	134
3.6 Statistical analysis	135
4. Results and discussion	135
4.1 Temperature and <i>P. fluorescens</i> effect on viable biofilms <i>L. monocytogenes</i> counts	135
4.2 Temperature effect on dual-species biofilms structure	136
4.3 Chitosan effect on <i>L. monocytogenes</i> and <i>L. monocytogenes</i> / <i>P. fluorescens</i> biofilms: viable cells	137
4.4 Changes on biofilms's structure induced by chitosan	137
5. Acknowledgments	139
6. Tables and figures	139
7. References	144

CAPÍTULO IV: *Listeria monocytogenes* biofilm association to other species, persistence and revival after chitosan exposure

147

1. Abstract	149
2. Introduction	150
3. Materials and methods	151
3.1 Bacterial strains	151
3.2 Experimental system	151
3.3 Antimicrobial testing	152
3.4 Cell recovery and counting	152
3.5 Biofilm recovery	152
3.6 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)	153
3.7 Statistical analysis	153

4. Results	153
4.1 Effect of the presence of <i>P. fluorescens</i> and the temperature of biofilm formation in <i>L. monocytogenes</i> tolerance to chitosan treatment	153
4.2 Effect of the presence of <i>P. fluorescens</i> and the temperature of biofilm formation in <i>L. monocytogenes</i> recovery after chitosan exposure	154
4.3 Structural changes of <i>warm</i> and <i>cold</i> dual <i>L. monocytogenes</i> / <i>P. fluorescens</i> biofilms after chitosan treatment	154
5. Discussion	155
5.1 <i>L. monocytogenes</i> tolerance to chitosan exposure in biofilms obtained under different conditions	155
5.2 <i>L. monocytogenes</i> recovery ability after chitosan exposure in biofilms obtained under different conditions	156
5.3 Structural changes after chitosan treatment and over recovery time of <i>warm</i> and <i>cold</i> <i>L. monocytogenes</i> 10p/ <i>P. fluorescens</i> biofilms	156
5.4 Changes in volumes occupied by live/dead cells along the revitalization period in <i>warm</i> and <i>cold</i> <i>L. monocytogenes</i> 10p/ <i>P. fluorescens</i> biofilms	157
6. Acknowledgments	158
7. Tables and figures	159
8. References	164

DISCUSIÓN INTEGRADORA	169
------------------------------	------------

1. SIMULACIÓN DE LOS BIOFILMS PORTADORES DE <i>Listeria monocytogenes</i> EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	171
1.1 El planteamiento	171
1.2 Cepas y persistencia	172
1.3 Biofilms de una y dos especies	172
1.4 El frío	176
1.5 El envejecimiento	177
2. CONTROL CON QUITOSANO DE LOS BIOFILMS SIMULADOS	178
2.1 Empleo del quitosano sobre biofilms	178
2.2 Efecto de la interacción entre especies sobre la susceptibilidad	180
2.3 Efecto del frío sobre la susceptibilidad	181

2.4 Recuperación de la acción del quitosano sobre <i>L. monocytogenes</i> en biofilms	181
CONCLUSIONES	185
Primera	187
Segunda	187
Tercera	187
Cuarta	187
Quinta	188
Sexta	188
BIBLIOGRAFÍA	189
APÉNDICES	235
1. Listado de figuras y tablas	237
2. Listado de abreviaturas	238
3. Listado de microorganismos	240

RESUMEN

1 OBJETIVOS

Evaluar el impacto de las bajas temperaturas, la interacción entre *P. fluorescens* (*Pf*) y *L. monocytogenes* (*Lm*) en biofilms (BF) mixtos y la capacidad para persistir de *Lm* sobre (i) la capacidad de *Lm* para desarrollar BF; (ii) los parámetros estructurales de los BF formados; (iii) la respuesta de las células adheridas de *Lm* frente al tratamiento con quitosano; (iiii) y su capacidad para recuperarse tras el tratamiento, tanto a nivel de densidad celular como estructural. Además, se pretendió valorar el quitosano como agente de limpieza y desinfección de los BF en la industria alimentaria, profundizando en su impacto sobre la estructura.

2 METODOLOGÍA

Para llevar a cabo estos objetivos se seleccionaron un total de 10 cepas de *Lm* (6 persistentes y 3 esporádicas aisladas por Ortiz y col. (2010) de una industria cárnica y la cepa *Lm* Scott A como referencia) y la cepa *Pf* ATCC 948TM para formar BF puros, de cada especie, y mixtos, de *Pf* y cada una de las cepas de *Lm*, iniciando los cultivos a un nivel de cada una de las bacterias de 10^4 UFC·ml⁻¹.

Para la formación de BF se empleó un sistema en *batch*, en el que cupones de vidrio desechables (22x22 mm) semisumergidos actuaron como soporte para la adhesión. Los BF se desarrollaron a 20°C (BF “templados”) y 4°C (BF “fríos”). Los tratamientos con quitosano al 1% (w/v) consistieron en la inmersión durante 1h. Para la recuperación, los cupones tratados se revitalizaron en medio fresco (Tryptone Soya Broth, TSB) a 20°C/48h. La densidad celular adherida antes, después y durante la revitalización se determinó mediante siembra del BF residual recogido del cupón en medios generales, o selectivos en el caso de los BF mixtos. Para la determinación de la biomasa adherida mediante densitometría ($\lambda=520-570$ nm), los BF fueron teñidos con una solución al 1‰ de azul de *coomassie*. Para las observaciones de la estructura mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM) las muestras se tiñeron con diferentes fluorocromos, procesándose las imágenes obtenidas mediante el software Imaris 8.2. El tratamiento estadístico de los datos se hizo con el software Statgraphics Centurion.

3 RESULTADOS

Si bien *Lm* logra formar BF monoespecie, en general, la presencia de *Pf* modifica esta capacidad según la cepa de *Lm*. Cuando se estudió la influencia de la persistencia, se encontró una peor compatibilidad con *Pf* en las cepas esporádicas, de media 1 log menos de células de *Lm* en los BF mixtos, tanto templados como fríos. El comportamiento de las cepas persistentes varió en función de la cepa y de la temperatura.

Al analizar la distribución de las especies en los BF mixtos, independientemente de la temperatura, se observó la tendencia de *Lm* a ocupar las regiones más profundas de las microcolonias, describiéndose una estructura estratificada donde *Lm* quedaba cubierta por capas de células y matriz de *Pf*. La estructura en los BF mixtos fríos, fue más compacta que la del resto de BF, tanto mixtos templados como puros de *Pf* de ambas temperaturas. Además, al cuantificar, mediante densitometría y CLSM, la biomasa (células viables y no viables+matriz) fue menor en los BF mixtos fríos que en los templados, pese a tener densidades de población similares. Los cambios observados por efecto de la edad aumentan presumiblemente la tolerancia a los agentes antimicrobianos.

La tolerancia frente al quitosano dependió del tipo de BF y de la cepa de *Lm*. El efecto antiBF del quitosano no afectó sólo a las células viables; se observaron además lesiones estructurales en forma de agujeros.

Pasadas 24h de recuperación la población de *Lm* en los BF residuales alcanzó los niveles previos al tratamiento, viéndose en general, la velocidad de recuperación aumentada por la presencia de *Pf* y disminuida por el estrés por frío durante el desarrollo de los BF.

4 CONCLUSIONES

- La presencia de *Pf* y las bajas temperaturas modificaron el comportamiento de *Lm* tanto en su capacidad para formar BF, como en su tolerancia al tratamiento con quitosano y posterior velocidad de recuperación, encontrándose una relación entre estos efectos y las modificaciones en la estructura, la matriz y la distribución de las especies.
- La capacidad para persistir de *Lm*, parece responder a un balance entre factores intrínsecos y extrínsecos, siendo la contribución de los primeros mayor en las cepas persistentes y de los segundos esenciales para las esporádicas.
- La capacidad del quitosano para aumentar la accesibilidad a las células del BF, le convierte en una herramienta potencialmente eficaz para controlar los BF en la industria alimentaria.

SUMMARY

1 AIMS:

In order to simulate *Listeria monocytogenes* (*Lm*)-carrying biofilms (BF) formed in food industry, this Ph. D. thesis tested the impact on *Lm*'s BF growth of: a) low environmental temperatures, b) interaction with *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) and c) the empirically checked ability, in a small collection of *Lm* strains, to persist in food industry facilities. Several aspects were analysed: i) viable *Lm* and *Pf* counts in mono- vs. binary species BF; ii) BF structure, visualized with Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) using different fluorescent labels and advanced software for image analysis; iii) effect of chitosan exposure in terms of viable cell reduction and structural damage and iv) ability of *Lm* in the different types of BF, to recover from chitosan action.

2 METHODOLOGY:

Ten *Lm* strains, including the reference strain Scott A, plus 9 isolates from meat industry, (6 persistent ones and 3 non-persistent) and *Pf* strain ATCC 948TM, were used to obtain mono- or 2 species BF, initiating cultures with 10⁴ CFU·ml⁻¹ of each. A batch system with semi-immersed (22x22 mm) glass coverslips as solid support, was incubated at 20°C for 48 or 144h (to get *warm* BF), or at 4°C for 10 and 20 days (for *cold* BF). BF were plated in general or selective media, to quantify viable counts. For densitometry, biomass was stained with Coomassie Blue. For CLSM observation, different labels were used to identify matrix, total or viable cells, and Gram-/Gram+ bacteria. CLSM input was processed with Imaris 8.2 software. Statistic analysis was performed with Statgraphics Centurion software.

3 RESULTS:

Though *Lm* is able to form mono-species BF, presence of *Pf* allows for mixed thicker BF, carrying more or less *Lm* viable counts than the mono BF. *Lm* persistent strains achieved to put more viable *Lm* counts into mixed BF, than in mono BF. Non-persistent *Lm*, less. Persistent strains were thus considered more compatible with *Pf*. To some extent, compatibility was temperature dependent.

In mixed *Pf/Lm* BF, a stratified spatial distribution pattern was observed. *Lm* displayed a temperature-independent trend to get located at the deeper layers of the mixed BF, in spite of its slower growth speed, compared with *Pf*. *Lm* cells ended up being covered by *Pf* cells and matrix. Mixed BF were more compact than pure *Pf* ones with a comparable viable cell content. And cold BF were more compact than warm ones, as well. BF shrinkage is not associated to cell loss. Rather, higher cell concentrations are there attained in those denser matrices. Higher density in BF is likely to imply lower diffusion rates.

Aged, dispersion-stage BF were studied. Warm BF appeared covered by a matrix blanket. Cold and old ones were thinner, but richer in *Lm* cells. Age-related BF changes will presumably increase *Lm*'s tolerance to both chemical and physical sanitation methods.

Susceptibility to chitosan was highly dependent on the type of targeted BF. Log reduction ranged between 1 and 5, being *Lm* mono species BF the most sensitive ones. Chitosan action produced large hollows in BF structure. When residual BF were allowed, after chitosan exposure, to revive for 48h in TSB growth medium at room temperature, clear BF differences in *Lm*'s recovery speed could be observed. That speed was faster in *Pf*'s company and slower in cold BF.

4 CONCLUSIONS:

- Presence of *Pf* and low temperatures modified *Lm*'s ability to form BF, to tolerate chitosan exposure and to revive after this. A relationship between those effects and certain changes in structure, matrix and spatial species distribution in BF was found.
- The ability of *Lm* strains to survive in food industry facilities, apparently results from a balance between intrinsic and extrinsic factors. Long-term persistence appears to rely mainly on intrinsic factors, whereas sporadic strains may benefit from extrinsic factors.
- Chitosan's competence to increase the accessibility to BF cells, makes it a valuable resource for BF control in food industry.

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR:

OBJETIVOS

La emergencia de *Lm* como patógeno de transmisión alimentaria, está relacionada con diversos cambios que a partir de la década de los setenta tuvieron lugar en las industrias alimentarias del momento. Estos suponían la implantación, de manera global, de mejoras en la higiene y la seguridad alimentaria durante la producción de alimentos. Incluían la optimización de los sistemas de limpieza y desinfección, además del uso extendido de la refrigeración. Pese a que se logró reducir la prevalencia de la mayoría de las enfermedades de transmisión alimentaria, estas medidas tuvieron un efecto colateral indeseado. *Lm*, dejó de tener competidores en el crecimiento a bajas temperaturas y ante otras situaciones de estrés.

Así, hoy por hoy, aunque la incidencia de la listeriosis sea baja en comparación con otras enfermedades de transmisión alimentaria como la campilobacteriosis, los brotes registrados suponen cifras elevadas de mortalidad y hospitalizaciones, de hecho, es considerada la tercera causa principal de muerte por intoxicación alimentaria en Estados Unidos y la primera, en el año 2013, en Europa. Embarazadas, personas de edad avanzada e inmunodeprimidos son los sectores de la población más sensibles a esta enfermedad. En Estados Unidos, se estima que *Lm* causa 1.600 hospitalizaciones y 250 muertes anuales, y aunque en los primeros años del siglo XXI la incidencia se redujo, ha permanecido invariable durante los últimos 6 años reportados. En Europa, con un sistema de producción comparable al americano, las cifras se repiten. En el año 2013, 1.763 casos confirmados de listeriosis dejaron 191 muertes, registrándose un aumento de su incidencia en el periodo 2009-2013 con respecto a épocas anteriores.

La constatación de la existencia de determinadas cepas de *Lm* formando BF, capaces de instalarse de manera casi permanente en las instalaciones agrava el problema. No está claro si estas cepas tienen propiedades específicas que les facilitan de alguna manera la permanencia en las plantas (*i.e.* mejor habilidad para la adhesión, para la formación de BF, para la respuesta frente antimicrobianos, para la adaptación a situaciones de estrés, etc.) o si son factores externos los que desencadenan la selección de estas cepas de *Lm*. En definitiva, los mecanismos implicados en la persistencia de *Lm* están aún sin determinar.

Además del estrés provocado por situaciones propias de la industria alimentaria, como las bajas temperaturas o los pH ácidos y la presencia de nichos favorables para el asentamiento de *Lm* donde la limpieza y desinfección tienen una acción limitada, uno de estos factores externos que está siendo objeto de estudio es la presencia de bacterias acompañantes, con las que *Lm* se puede asociar en BF multiespecie. Numerosos estudios demuestran que en la naturaleza y en la industria son el modo de vida preferencial. Aunque no se han definido aún los principios que rigen las interacciones ecológicas en BF, se ha encontrado que de esta manera las bacterias son más tolerantes frente a los antimicrobianos.

Vencer los problemas de acceso de los biocidas hasta las células englobadas en el BF es uno de los grandes retos. Por otro lado, para mejorar la eficacia de los sistemas de limpieza y desinfección, resulta imprescindible evaluar diversas alternativas sobre BF desarrollados en condiciones ambientales similares a las encontradas en los entornos del procesamiento de alimentos.

Por ello, los objetivos planteados en esta tesis fueron:

Primero: Evaluar el impacto, sobre la cantidad de *Lm* en BF, de las bajas temperaturas, la compañía de *Pf*, la incubación prolongada y la persistencia, estudiando tanto la densidad de células viables, como los aspectos estructurales. En función de esos mismos factores:

Segundo: Estudiar las modificaciones de la estructura de los BF.

Tercero: Estudiar la respuesta de las células adheridas de *Lm* frente al tratamiento con quitosano, tanto en términos de viabilidad celular como a nivel estructural.

Cuarto: Caracterizar la recuperación tras el tratamiento con quitosano de los BF residuales conteniendo *Lm* en condiciones favorables para el crecimiento.

Quinto: Evaluar el posible papel del quitosano para el control de los BF en la industria alimentaria.

INTRODUCCIÓN

1 BIOFILMS

1.1 CONCEPTO

En los inicios de la microbiología, en tiempos de Pasteur, la búsqueda de microorganismos se llevaba a cabo en medios de cultivo líquidos ricos en nutrientes. Sin embargo, en la actualidad, está establecido que el modo de vida microbiana predominante no son los cultivos en suspensión sino las comunidades microbianas adheridas, los BF (Brooks y Flint, 2008) además de medios con frecuencia pobres.

El descubrimiento de los BF se atribuye a Antony van Leeuwenhoek, quien observó por primera vez un BF en la superficie de los dientes utilizando un microscopio primitivo (Donlan, 2002). Hubo que esperar a la llegada de la microscopía electrónica (SEM) para permitir observaciones de alta resolución y de mayores aumentos, como las que obtuvieron Jones y col. (1969), al observar los BF formados en los filtros de una planta de tratamiento de aguas residuales. Este estudio, basándose en la morfología celular, mostró cómo dichos BF estaban compuestos de una variedad de organismos. De hecho, cualquier microorganismo e incluso células eucariotas, pueden formar parte de un BF, aunque los más conocidos y estudiados son los constituidos por bacterias.

El concepto de BF ha evolucionado considerablemente desde su descubrimiento y aún se sigue debatiendo sobre cuál es la definición más adecuada. Quizá el problema reside en la variabilidad tan amplia encontrada en cuanto a sus características, que dificulta establecer una definición en la que todas las posibilidades estén englobadas. Un término muy próximo al concepto de BF, es el bioensuciamiento o *biofouling*, que se define como la acumulación indeseable de contenido biótico sobre una superficie (Characklis, 1990), incluyendo macroalgas e invertebrados como percebes y mejillones (*macrobiofouling*) y microorganismos (*microbiofouling*). Aunque los BF puedan entenderse como un concepto amplio centrado en la agregación, no limitado a superficies abióticas ni a un tipo concreto de entorno, cuando un BF se desarrolla en una superficie abiótica (*i.e.* del entorno industrial, hospitalario, etc.) y ocasiona problemas, entonces puede hablarse de *biofouling* (Flemming, 2011). Aunque los BF estudiados más frecuentemente son los indeseados, existen también BF de utilidad práctica, como forma natural de inmovilización de microorganismos, para tratar efluentes o producir aditivos alimentarios u otros productos químicos. En esta memoria, se utilizará siempre el término de BF, refiriéndose a microorganismos colonizando sustratos abióticos o bióticos, en entornos naturales o manufacturados.

Marshall (1986), distinguió 3 formas de adhesión bacteriana, que denominó adhesión específica, temporal y no específica. La primera implica uniones de alta afinidad entre bacterias y células eucariotas. La temporal, se refiere a la usada por las bacterias filamentosas para moverse a lo largo de superficies. Y por último, la adhesión a

superficies inertes o adhesión no específica, que contempla la adhesión de bacterias a superficies inertes, dependiente en su inicio de interacciones físicoquímicas y reforzada por un gel adhesivo.

A este tipo de adhesión no específica se refirieron Hood y Zottola (1995) cuando definieron los BF bacterianos como un grupo de bacterias que han colonizado una superficie, indicando que no solo las bacterias forman parte del BF sino también los materiales extracelulares formados por ellas y otros materiales atrapados en esa matriz. Más adelante y gracias a los avances en genómica y proteómica, este primer y sencillo concepto, se ha ampliado. El BF deja de verse como una mera asociación de microorganismos unidos a una superficie y rodeados de cierto material y pasa a contemplarse como un cambio complejo y sofisticado en el modo global de vida microbiana, que pasa de móvil a fijo y conlleva cambios a nivel fenotípico. Donlan y Costerton (2002) definieron los BF como comunidades microbianas, caracterizadas por células adheridas a un sustrato o interfase (aire-sólido, aire-líquido, líquido-líquido) o unas a otras, englobadas en una matriz gelatinosa de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ellas mismas producen y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al crecimiento, expresión génica y producción de proteínas. Esta definición es una de las más aceptadas y empleadas en las publicaciones científicas. En ella se contemplan 4 aspectos esenciales en todo BF: comunidad, adhesión o agregación, matriz y fenotipo.

Comunidad: parece relevante que una característica constitutiva de los BF sea la asociación de microorganismos. Es decir, que se forme un conjunto multicelular de organismos que crean una comunidad organizada y adaptada al medio en el que se encuentra con el objetivo de sobrevivir. De este modo, un BF no podría estar formado por una única célula microbiana, sino que es un modo de vida en comunidad. Este aspecto de comunidad ha sido remarcado recientemente por otros autores, quienes se refieren a los BF como el resultado de la interacción multicelular de los microorganismos, adoptando estructuras que reflejan las complejas relaciones entre sus componentes individuales (Haussler y Fuqua, 2013). En este caso, además del aspecto de comunidad, se ha puesto énfasis en la complejidad que supone este modo de vida. Cuando las situaciones ambientales en las que se encuentran los microorganismos en suspensión se vuelven adversas (*i.e.* ante la escasez de nutrientes), los microorganismos se adhieren y organizan para formar un BF, adoptando un modo de vida más seguro. Algunos autores se han referido a los BF como una “fortaleza” (Bridier y col., 2015) construida por los microorganismos, haciendo analogía con las construcciones defensivas que levantaban nuestros antepasados para defenderse de los ataques de los enemigos. De hecho, los BF son actualmente considerados como el primer signo de vida en la Tierra, encontrándose fósiles datados de 3,5 billones de años (Schopf y col., 1983). Así, Stoodley y col. (2002), sugieren que en el proceso de evolución, las bacterias podrían haber desarrollado su fenotipo de BF con anterioridad al de células en

suspensión, para sobrevivir en ambientes hostiles. De modo que el fenotipo planctónico (células en suspensión) se habría desarrollado más tarde para la diseminación y la colonización de nuevos hábitats.

Adhesión o agregación: en un intento de poner nombre a las diferentes fases que se observaban en el proceso de desarrollo de los BF, fueron varios los términos utilizados. Se dice que las células son adsorbidas a la superficie o adheridas (*adhered*) en los inicios del proceso de formación. Cuando el desarrollo de BF avanza, las células quedan pegadas o amarradas de manera permanente (*attached*) (Hood y Zottola, 1995). Con independencia del término usado, las células en el BF están íntimamente en contacto con un sustrato y la fuerza de unión entre las células y el sustrato depende del momento del desarrollo en el que se encuentre el BF. Cabe destacar que no necesariamente este sustrato debe ser una superficie (biótica o abiótica), sino que se contemplan posibilidades de adhesión a una interfase de cualquier tipo. Por ejemplo, las biopelículas, *pellicle biofilm*, como describió Ferdinand Cohn (1876), se forman en interfases líquido-aire (Ostrowski y col., 2011; Vlamakis y col., 2013), procediendo los nutrientes de la fase líquida y el oxígeno de la fase aérea. En la naturaleza aparecen por ejemplo en la superficie de las aguas o en la producción del vinagre, y son muchos los sustratos a los que pueden fijarse los microorganismos. Pueden adherirse a tejidos vivos (*i.e.* la placa dental), o a sólidos naturales (*i.e.* las rocas del borde en un río), así como a superficies abióticas encontradas en entornos marinos (*i.e.* las paredes de los barcos), industriales (*i.e.* interior de tuberías) o clínicos (*i.e.* interior de un catéter). En la figura 1 se resumen los diferentes modelos de BF que pueden encontrarse.

Matriz: aunque más adelante se hablará en extenso sobre esta matriz, un aspecto a destacar es que está compuesta por materiales que los propios microorganismos han producido. Además es adherente y gelatinosa, lo que otorga al BF en su conjunto, importantes propiedades mecánicas.

Fenotipo: estas comunidades multicelulares se caracterizan por un elevado nivel de especialización así como de comunicación entre las células que la forman, lo que hace posible la adaptación y permanencia de dicha comunidad (Donlan y Costerton, 2002; Stewart y Franklin, 2008). Las células que forman parte del BF exhiben un fenotipo diferente, esto es, un perfil distinto en cuanto a expresión génica y producción de proteínas del expresado por las células planctónicas. Estos cambios incluyen por ejemplo la capacidad de generar esa matriz de EPS o tener una menor tasa de crecimiento. La diferenciación de las células adheridas durante el desarrollo ha sido objeto de estudio desde 1982 (Stoodley y col., 2002) aunque se ha avanzado mucho más desde la aparición de las técnicas óhmicas y su aplicación al estudio de los BF. Desde entonces las investigaciones han traído consigo varios modelos que entienden el desarrollo de los BF como un proceso de adaptación y cambio genético.

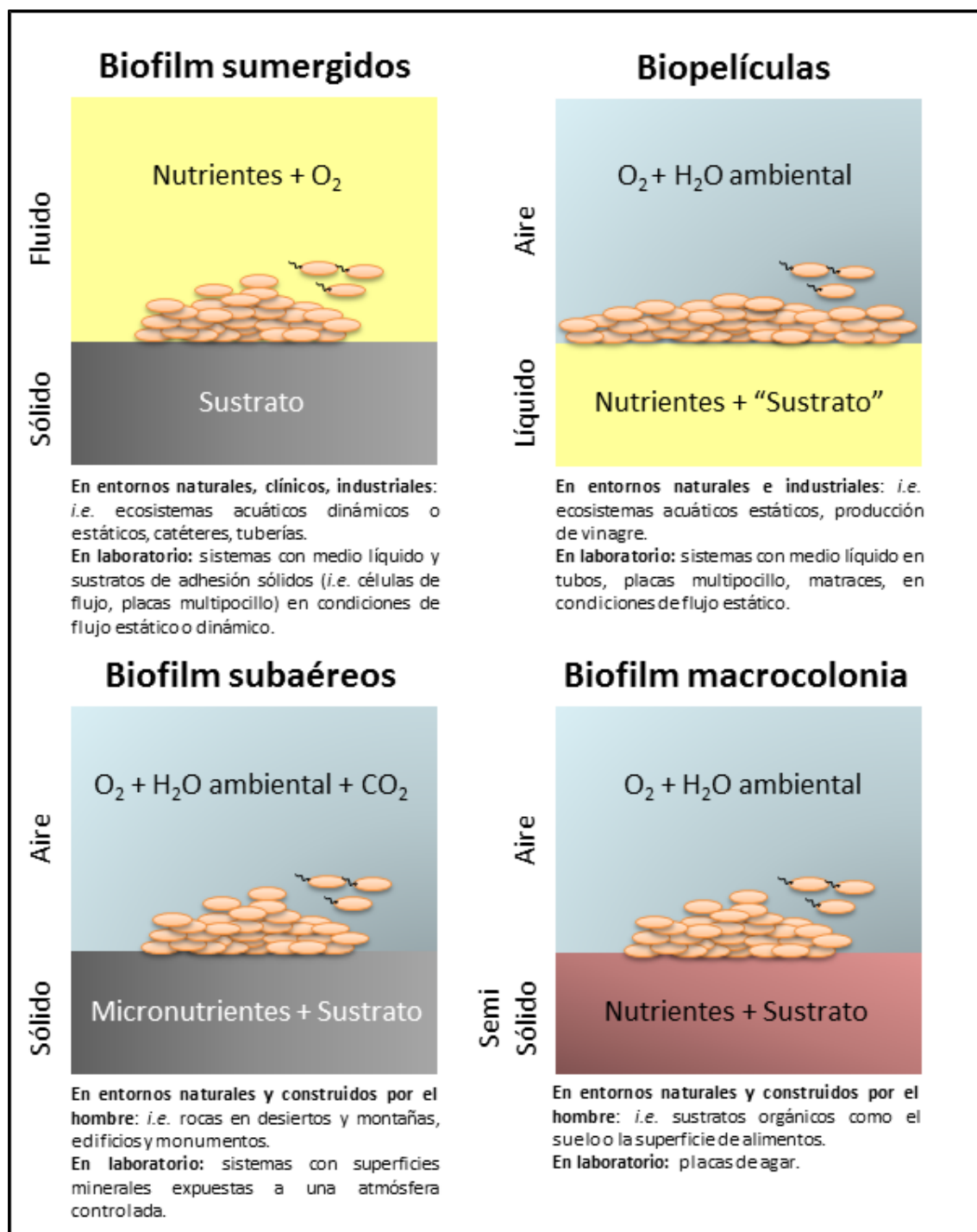


Figura 1. Modelos de biofilm. Representación esquemática de 4 ejemplos típicos de biofilms que ocurren en la naturaleza y en entornos construidos por el hombre. (Adaptado de Serra y Hengge, 2014).

1.2 MATRIZ

Como se decía en el apartado 1.1 *Concepto*, uno de los rasgos principales que diferencia a los BF de las células en suspensión es la formación de la matriz extracelular que las engloba. Esta matriz está compuesta en su mayor parte por agua (95-97%) junto con las

EPS que las mismas bacterias producen, así como restos provenientes de la lisis celular y del entorno que se pueden integrar en el entramado (Flemming y Wingender, 2010). Así, la mayoría de autores hablan de matriz de EPS, aunque algunos se refieren a ella como matriz extracelular (ECM) (Steinberg y Kolodkin-Gal, 2015). Pero en lo que parece no haber duda es en que constituye un aspecto muy importante del BF, ya que la estructura tridimensional, la concentración, especificidad y naturaleza de los diversos componentes de la matriz, su cohesión, carga y capacidad de sorción determinan el modo de vida en el BF (Flemming y Wingender, 2010).

Sin embargo, es una realidad compleja de estudiar. Sus características están sujetas a factores como el tipo de microorganismo, la mecánica de los fluidos, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Y, aunque ha sido objeto preferencial de estudio, aún hay cuestiones carentes de explicación como los patrones de regulación, la producción de EPS en BF mixtos y algunos aspectos de especificidad (un mismo compuesto tiene papeles diferentes en función del BF en el que se forme), entre otros (Flemming y Wingender, 2010).

1.2.1 Composición de la matriz

La composición de la matriz ha sido estudiada en BF monoespecie y se sabe que difiere entre especies y que se modifica con las condiciones de crecimiento. Aparte del agua, está compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que las mismas células producen y excretan (las llamadas EPS) (Fig. 2). También se integran en el entramado flagelos, pili y fimbrias, así como vesículas, enzimas y DNA extracelular (eDNA) procedentes de la lisis celular o del medio circundante (Combrousse y col., 2013; Flemming y Wingender, 2010; Steinberg y col., 2015).

1.2.1.1 *Polisacáridos*

Los polisacáridos son en la mayoría de las especies el componente mayoritario (Flemming y Wingender, 2010). Algunos de ellos, presentan estrechas similitudes con algunas moléculas de origen vegetal, por lo que inicialmente se les dio su nombre. Es el caso del alginato y la celulosa, a pesar de tener ciertas diferencias en patrón de monosacáridos, posición de los enlaces glicosídicos, tipo y grado de sustituciones en azúcares.

El papel de los polisacáridos en la estructura parece ser por un lado, el de retener agua y formar un gel que protege a las células y otorga a la matriz propiedades mecánicas. Por otro lado, juegan un papel fundamental en el desarrollo estructural de los BF para numerosas especies, ya que mutantes con defectos en la producción de estas sustancias, muestran severos defectos en la formación del BF así como en la adquisición de la compleja arquitectura tridimensional característica de los BF

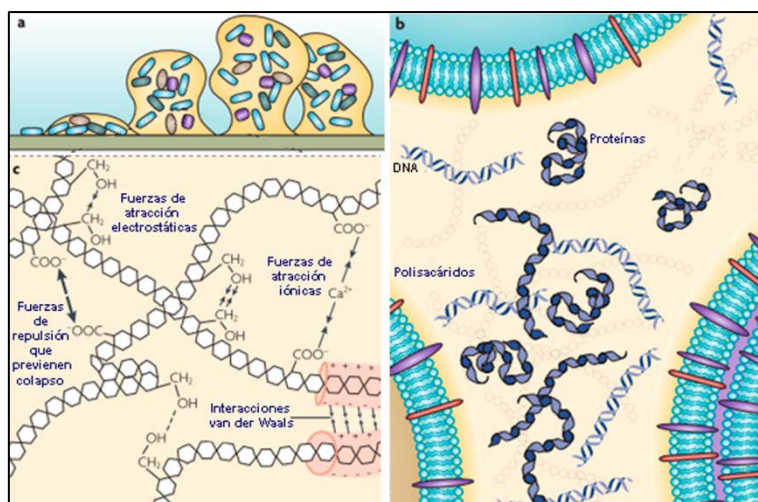


Figura 2. Diferentes dimensiones de la matriz de EPS. (A) Esquema de un biofilm desarrollado sobre un sustrato sólido. Adhesión, maduración y dispersión; (B) Componentes mayoritarios de la matriz de un biofilm (polisacáridos, proteínas y eDNA). (C) Interacciones que estabilizan la matriz. Adaptado de Flemming y Wingender (2010).

(Steinberg y Kolodkin-Gal, 2015). Por ejemplo, la síntesis del ácido colánico, principal componente de las EPS de *Escherichia coli*, es vital para la formación de la estructura del BF (Danese y col., 2000). Otro ejemplo es el de la poli-N-acetilglucosamina (PNAG), también llamado polisacárido de adhesión intercelular (PIA), que se diferencia de la quitina en la posición de los enlaces glicosídicos y el grado de acetilación. Esta molécula resulta esencial para la adhesión de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Lin y col. (2015) observaron que una cepa mutante de *S. aureus* que no podía sintetizar PNAG, formó BF defectuosos que se restablecieron al incorporar el plásmido que se había suprimido.

Aunque entre los polisacáridos descritos como componentes de la matriz se encuentran homopolisacáridos, son más comunes los heteropolisacáridos. En cuanto a los primeros, son un ejemplo los glucanos y fructanos derivados de la sacarosa que pueden aparecer en las matrices de *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp. y varias especies de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. Por otra parte, los heteropolisacáridos están constituidos por mezclas de azúcares neutros y cargados que pueden contener o no sustituyentes orgánicos e inorgánicos, afectando a sus características físicas y biológicas. En cuanto a su carga, la mayoría tienen carga negativa (alginato, xantano, ácido colánico), pero también están presentes algunos policatiónicos como la PNAG de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Cabe decir que la heterogeneidad en la presencia de polisacáridos es muy amplia, llegando las diferencias hasta el nivel de cepa. Además, una misma especie puede producir más de un exopolisacárido, simultáneamente o secuencialmente, en función de

factores ambientales o de diferencias a nivel de cepa (Steinberg y Kolodkin-Gal, 2015). Es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los microorganismos más estudiados en cuanto a su matriz. Tres polisacáridos pueden estar presentes en la matriz de esta bacteria: alginato, Psl y Pel (Franklin y col., 2011), siendo el primero el más importante. El alginato es un polímero de ácido manurónico y ácido gulurónico cuya síntesis depende del operón *alg* y 12 genes adicionales (Hay y col., 2010). El Psl, está compuesto de manosa, ramnosa y glucosa y su síntesis está codificada en el operón *pslA-O* (Byrd y col., 2009; Friedman y Kolter, 2004; Jackson y col., 2004; Matsukawa y Greenberg, 2004). Por último, Pel es un polímero rico en glucosa cuya síntesis depende del operón *pelA-G* (Colvin y col., 2011; Friedman y Kolter, 2003).

Cada uno de los polisacáridos tiene un papel. El alginato parece estar implicado en el establecimiento de las microcolonias (unidad básica estructural del BF) en las fases iniciales de la formación del BF, además de ser responsable de la estabilidad mecánica de los BF maduros. Pel es esencial en los BF formados en superficies o en interfases aire-líquido velos (*pellicles*), mientras que Psl juega un papel relevante en la adherencia a superficies bióticas o abióticas así como en el mantenimiento de la arquitectura del BF. En concreto, el Psl, al aparecer anclado en la superficie de las células, posiblemente favorezca las uniones célula-célula (Flemming y Wingender, 2010).

1.2.1.2 Proteínas

Aunque en muchas especies la fracción polisacáridica de la matriz es la mayoritaria (*Pseudomonas* spp., *E. coli*, *S. aureus*), la proporción proteica es importante en otras especies como *Bacillus subtilis* y *Lm*, y la presencia de eDNA es esencial para la estabilidad de la matriz en especies tales como *Lm* (Harmsen y col., 2010).

Los compuestos de naturaleza proteica que forman parte de las EPS pueden ser diversos. Por un lado, se han encontrado enzimas y por otro, proteínas estructurales o de tipo amiloide. Entre las enzimas que se han descrito, algunas son degradadoras de biopolímeros solubles (polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos) o insolubles (celulosa), o de compuestos orgánicos atrapados en el BF. Este hecho es relevante desde el punto de vista biológico, pues supone que los grandes componentes de la matriz pueden ser digeridos hasta compuestos de bajo peso molecular, susceptibles de ser utilizados como fuente de carbono y energía por las células albergadas en el BF, además de dejar libres a estas mismas células. La localización de estas enzimas en la matriz del BF es también relevante. Altas concentraciones están estratégicamente alojadas cerca de las células, manteniéndose en el entramado mediante interacciones con polisacáridos, facilitando a las propias células optimizar el uso de los compuestos derivados de su actividad (Busalmen y col., 2002). Además, esta situación específica podría proporcionarles cierta, termoestabilidad y protección frente a la proteólisis (Skillman y col., 1998).

Las enzimas modificadoras de las EPS, se suponen implicadas en la fase de dispersión del BF. La degradación de los componentes de la matriz provoca su desmantelamiento (Sauer y col., 2004). Una de las enzimas con este papel es la N-acetil-b-hexoaminidasa (dspB) identificada en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan y col., 2004).

Están también las proteínas estructurales. Estas proteínas participan en la formación y estabilización de la red de polisacáridos de la matriz, constituyendo un nexo entre la superficie de las células y los polisacáridos o en el reconocimiento de determinados sustratos. Pueden ser proteínas de membrana o lectinas (proteínas que se unen a exopolisacáridos). Algunos ejemplos de estas proteínas son la proteína ligadora de glucano en *Streptococcus mutans*, o LecA y LecB en *P. aeruginosa*.

Otro grupo de compuestos proteicos son las proteínas amiloides, agregados proteicos que pueden constituirse como fibras insolubles (Fowler y col., 2007) implicados en la adhesión a superficies abióticas y células del hospedador, jugando un papel relevante en los procesos de invasión. Se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Una de las más estudiadas es la TasA, producida por *B. subtilis* (Chai y col., 2013; Romero y col., 2010), que aparece adherida a la superficie celular y media las uniones célula-célula (Romero y col., 2010). Además, las FapC en *Pseudomonas* spp., y los curli de *E. coli* o *Salmonella* spp., son ejemplos bien descritos (Chapman y col., 2002; Dueholm y col., 2010; Romero y col., 2010). TapA y SipW son también proteínas de este tipo.

Las llamadas proteínas asociadas a superficies de BF (Bap) tienen alto peso molecular y están ancladas a la superficie de algunas bacterias en las que favorecen la formación de BF (Lasa y Penadés, 2006). En el caso de *Vibrio* spp., Bap1, junto con RbmA y RbmC, también proteínas, y determinado polisacárido (VPS), son esenciales para la formación de BF (Fong y col., 2006; Fong y Yildiz, 2007; Berk y col., 2012).

Por último, apéndices como los pili, las fimbrias y los flagelos pueden jugar un papel desde el punto de vista estructural en la matriz pues interaccionan con otros componentes y permiten distintos tipos de movilidad. Un ejemplo es el pili tipo IV de *P. aeruginosa* que se une al eDNA (van Schaik y col., 2005) o, en el caso de *Salmonella* Typhimurium y *E. coli*, una fimbria que se agrega a la celulosa, dando lugar a una matriz extremadamente rígida (Zogaj y col., 2001).

Para entender la complejidad de los procesos de ensamblaje de los diversos componentes de la matriz, ha sido particularmente útil un trabajo de Berk y col. (2012). Estos autores, usando marcadores específicos y CLSM, visualizaron a tiempo real las 3 proteínas intervinientes en el desarrollo espacial de los BF de *Vibrio cholerae* mencionadas anteriormente. Las células aparecían mayoritariamente organizadas en

microcolonias con forma alargada, ensambladas mediante empaquetamientos tridimensionales de tal manera que eran capaces de repararse, alargarse y expandirse según las necesidades de crecimiento del BF. Estos empaquetamientos estaban formados por RbmC, Bap1 y el polisacárido VPS siendo mayor la participación de Bap1 en la interfase BF-sustrato donde no aparecía RbmC. Según los autores, todo parece indicar que Bap1 tendría 2 funciones. Por un lado formar el complejo que encapsula a las microcolonias y por otro intervenir en la adhesión de las células a la superficie. La proteína RbmA, se ubicaba en las zonas periféricas del BF donde parece participar en los procesos de adhesión célula-célula, ya que los mutantes sin esta proteína, alcanzaban menor crecimiento en las microcolonias. Al examinar con mayor detalle los momentos iniciales de la adhesión, los autores vieron que la primera proteína en aparecer en la superficie de la bacteria fue RbmA, haciendo que también su correspondiente célula sucesora quedase unida al sustrato tras la división celular. Después, apareció Bap1 en el punto de unión entre las 2 células y también en la interfase BF-sustrato. Así, tras las divisiones sucesivas, Bap1 iba acumulándose gradualmente de forma radial, sugiriendo los autores que las primeras células en adherirse estarían continuamente secretando la proteína, que iría acumulándose en su entorno cercano. La tercera proteína, RbmC, apareció tras 90 min del inicio de la adhesión y en puntos concretos de la superficie celular. Más adelante, observaron la formación del complejo RbmC-Bap1, expandiéndose en todas direcciones. El polisacárido VPS iba siendo progresivamente excretado por las células, formando un polímero flexible que aportaba continuidad mecánica a la matriz. Este VPS parece ser requerido para la acumulación de proteínas y por consiguiente para la formación del BF, ya que las descendientes de las células de las cepas VPS negativas, no se agregaban sobre la superficie, sino que aparecían dispersas en el medio.

Puede verse con este ejemplo cómo el proceso de formación de BF y su matriz, supone una compleja secuencia temporal y espacialmente heterogénea de secreción de proteínas, polisacáridos y otros compuestos que tienen funciones específicas en el ensamblaje de la arquitectura del BF.

1.2.1.3 Ácidos nucleicos

En cuanto a la presencia y la función del DNA, algunas observaciones indican un sorprendente papel de este polímero en la estructura de los BF. En concreto, se ha demostrado que la presencia de eDNA en la matriz de *Pseudomonas* (Allesen-Holm y col., 2006), *Streptococcus* (Moscoso y col., 2006) y *Staphylococcus* spp. (Izano y col., 2008; Mann y col., 2009; Qin y col., 2006) tiene un efecto crítico sobre la adhesión y/o la estructura del BF. Sobre el origen de este eDNA, se cree que responde a mecanismos de lisis celular (Mann y col., 2009; Qin y col., 2006) y mecanismos independientes de lisis celular, que hacen referencia a un posible transporte activo a través de vesículas (Spoering y Gilmore, 2006).

En cuanto a la primera, hay estudios que postulan cierta relación entre la liberación de DNA y el *quorum sensing* (QS), sugiriendo un posible mecanismo coordinado para la liberación de DNA y su integración en la estructura del BF (Spoering y Gilmore, 2006). En concreto, uno de los sistemas de péptidos con papel en QS de bacterias Gram positivas es el llamado péptido señal de competencia (CSP). Cuando CSP alcanza la concentración umbral, una fracción de la población es lisada y el DNA liberado es utilizado por la población restante. Thomas y col. (2009) describieron en BF de *Enterococcus faecalis*, cómo al alcanzar una concentración celular elevada, una parte de la población en respuesta a señales de QS, sintetizaba una autolisina que provocaba la lisis de una parte de sus células vecinas (aquellas que carecían de una proteína que interaccionaba con la autolisina bloqueando su acción), fenómeno denominado “fratricidio microbiano”. El DNA liberado estabilizaba así el BF de *E. faecalis*.

Tanto la cantidad de eDNA como su localización en la matriz parece no ser una constante. Por ejemplo, mientras que en *S. aureus* se ha descrito una elevada concentración, esta es mínima en *S. epidermidis* (Izano y col., 2008). En cuanto a su localización, en *P. aeruginosa* se ha observado que se encuentra en los bordes de las torres de champiñón (Flemming y Wingender, 2010).

Como se mencionaba anteriormente, algunos autores (Gilmore y Haas, 2005; Y.-H. Li y col., 2002; Loo y col., 2000; Molin y Tolker-Nielsen, 2003; Petersen y col., 2004) sugieren que este DNA liberado es importante para la estabilización de la estructura del BF. En particular, un estudio realizado con *Staphylococcus intermedius* mostró cómo la adición de CSP tuvo un efecto positivo sobre la formación de BF (Petersen y col., 2004), suponiendo además un incremento de la biomasa adherida. En presencia de DNAasa I y otras endonucleasas no se registró ese aumento de biomasa. Un estudio similar con *S. mutans* mostró no solo una correlación entre la presencia de CPS y el aumento de la formación de BF, sino también un aumento del nivel de eDNA presente en la matriz (Petersen y col., 2005). Pero todavía no está del todo claro si este papel del eDNA se ejerce solo a nivel estructural o si tiene algún otro efecto sobre las células, por ejemplo manteniendo los niveles de biomasa elevados. Por ejemplo el eDNA, al establecer uniones con otros componentes de la matriz, podría promover la estabilidad e integridad del BF (Okshevsky y Meyer, 2015; Okshevsky y col., 2015) (Fig. 3). En cuanto al mantenimiento de los niveles de biomasa, la naturaleza química del DNA (que tiene carga negativa) podría hacer que interviniera en las propiedades de membrana, fomentando la adhesión entre células y entre estas y el sustrato de adhesión (Spoering y Gilmore, 2006). También se ha descrito una posible actividad antimicrobiana del eDNA, provocando la lisis celular al quelar cationes que estabilizan los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias (Flemming y Wingender, 2010).

Según algunos autores, este papel del eDNA puede variar según la edad del BF. Así, la dispersión provocada por la DNAasa en *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae* y

P. aeruginosa PAO1 (Mann y col., 2009; Okshevsky y col., 2015; Qin y col., 2007; Seper y col., 2011) es dependiente de la edad del BF. Podría ser que el papel del eDNA es importante en la matriz cuando los BF son jóvenes pero luego ese papel pasa a ser desempeñado por otros compuestos (Okshevsky y Meyer, 2015).

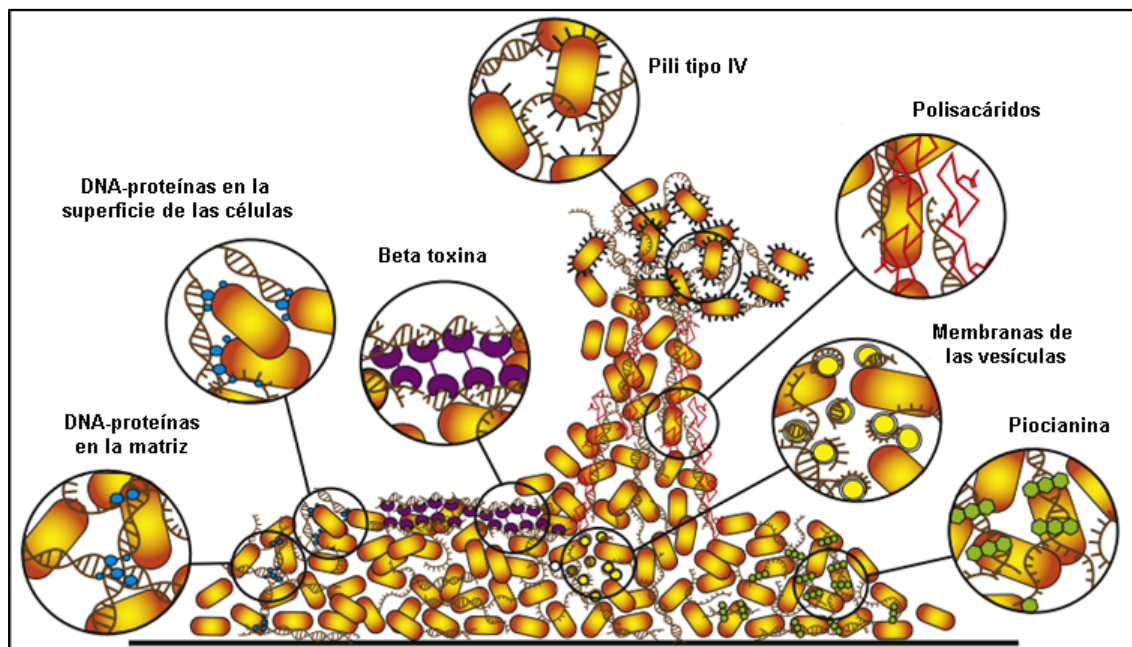


Figura 3. Interacciones posibles entre el eDNA y otros componentes de la matriz de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Okshevsky, Regina y Meyer (2015).

En algunas especies, la presencia de este eDNA parece claramente esencial para la integridad de la estructura (Harmsen y col., 2010). En concreto, en los BF de *Lm* el eDNA podría ser el organizador central de la matriz, siendo su presencia necesaria tanto para la adhesión inicial de las bacterias al sustrato, como para los primeros estadios de la maduración del mismo. Harmsen y col. (2010) han mostrado el impacto del eDNA en la formación de BF con 41 cepas de *Lm*. Tras 24h de crecimiento, la biomasa adherida fue completamente dispersada al añadir al cultivo DNAasa I. A diferencia de los resultados anteriores con *S. epidermidis*, en los que el efecto de la DNAasa I se iba reduciendo a lo largo del tiempo y tras 12h era ya poco apreciable (Qin y col., 2007), en el caso de *Lm*, tras 48h todavía gran parte de la biomasa adherida era retirada del BF por acción de la DNAasa. Harmsen y col. concluyeron que la fuerte dependencia entre el eDNA y la formación de BF en *Lm*, podría explicarse como una supuesta incapacidad de esta bacteria para producir polisacáridos como los que forman parte de la matriz de otros microorganismos. De hecho, basándose en los resultados de su estudio, los autores propusieron que, fragmentos de eDNA de alto peso molecular junto con la N-acetilglucosamina (NAG) podrían formar un polímero con propiedades similares a las de PNAG de *Staphylococcus* y *E. coli*.

1.2.1.4 Surfactantes y lípidos

Aunque se habla muy poco de este grupo de moléculas, también pueden estar presentes en la matriz de los BF. Son sustancias de naturaleza lipídica o híbrida tales como los lipopolisacáridos de *Thiobacillus ferrooxidans*, esenciales para su adhesión a superficies de pirita. Otros ejemplos son la surfactina, la viscosina y el emulsano, capaces de dispersar sustancias hidrofóbicas y hacerlas biodisponibles (Flemming y Wingender, 2010).

1.2.1.5 Agua

Es el componente mayoritario (95-97%). Una parte está ligada a las moléculas presentes en la matriz y el resto se comporta como solvente. Así, juega un papel importante en la difusión y sus propiedades dependen de la naturaleza y concentración de los solutos disueltos (Schmitt y Flemming, 1999).

Gracias a la presencia y retención del agua, el BF es más resistente a la desecación evitando el drenaje de las células y otros efectos negativos de las fluctuaciones en el potencial de agua (Potts, 1994).

1.2.2 Propiedades de la matriz

La integridad y las propiedades mecánicas de la matriz son producto de los compuestos que la forman, su naturaleza, las interacciones entre ellos, su disposición y heterogeneidad, así como del tamaño de poro, afectando en última instancia a las propiedades de deformación y la permeabilidad (Billings y col., 2015; Flemming y Wingender, 2010; Steinberg y Kolodkin-Gal, 2015).

1.2.2.1 Permeabilidad

En cuanto a la permeabilidad de la matriz, que determina la entrada y circulación de fluidos y solutos por el BF, se han descrito 2 alternativas en función de las características del flujo. En ausencia de flujo, la difusión es el mecanismo que domina el transporte de solutos en el BF. Las moléculas recorren el interior del BF pasando a través de los poros y recorriendo los canales como si de carreteras se tratase. En cambio, cuando existe flujo, se combinan los fenómenos de difusión, turbulencia y fricción en el transporte a través de los canales del BF (Stewart, 2012).

Por otro lado, recientemente, algunos autores han descrito el movimiento nadador “subrepticio” (*stealth swimming*) de células planctónicas “tunelando” su camino por el interior del BF (Houry y col., 2012). Este desplazamiento puede tener un interés biológico al facilitar el transporte de células, nutrientes y de oxígeno hasta lo más profundo del BF. Por tanto a la difusión y la advección citadas anteriormente, habría que

sumar la movilidad celular a la hora de considerar las posibilidades de transferencia de masa dentro de los BF (Boles y Horswill, 2012).

Desde el punto de vista de la difusión, como la matriz es un entramado de materiales constituidos en gran parte por polielectrolitos, la carga positiva o negativa del conjunto influirá en el fenómeno (Flemming y Wingender, 2010). En este sentido, las propiedades aniónicas vienen dadas por los sustituyentes carboxílicos de los polisacáridos, los aminoácidos ácidos (aspartamo y glutámico) y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Los grupos catiónicos son aportados por los azúcares aminados, los aminoácidos y las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos. Muchos de estos grupos están presentes como sustituyentes de los monómeros de los exopolisacáridos.

Una clara consecuencia de que la permeabilidad de la matriz condiciona el modo de vida del BF, es el aumento de la resistencia frente a antibióticos y desinfectantes que experimentan las células dentro del BF (Billings y col., 2015), de las cuales se hablará más adelante.

1.2.2.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los BF dependen de su estructura interna y están por tanto estrechamente relacionadas con la matriz y su composición. Aunque el papel de la masa celular y del anclaje de las EPS a las células no debe subestimarse, las propiedades mecánicas del BF suelen atribuirse a las propiedades de la matriz.

Al tratarse de una mezcla de agua y moléculas, la matriz no tiene un comportamiento ni puramente viscoso ni puramente elástico. La reología es el estudio de las respuestas de los materiales cuando se les aplica una fuerza. Aunque algunos BF se comportan predominantemente como geles y otros como fluidos viscosos, el comportamiento reológico más habitual suele ser de *shear thinning*, es decir, el de un fluido pseudoplástico (Billings y col., 2015) que disminuye su viscosidad cuando es sometido a fuerzas de cizalla, aunque también tiene propiedades viscoelásticas, presentando deformaciones irreversibles a partir de determinada fuerza aplicada (Klapper y col., 2002). Los responsables primordiales de estas propiedades son los polisacáridos, pero es probable que determinadas proteínas jueguen también un papel apreciable.

La cohesividad y la adhesividad son propiedades de la matriz que además de la composición de la misma, están influenciadas por las características del medio, tanto dinámicas (fuerzas de rozamiento) como biológicas (situaciones de estrés). Por ejemplo, la presencia de iones multivalentes inorgánicos pueden modificar las propiedades mecánicas del BF. Y en cuanto al medio, algunos autores indican que en respuesta a condiciones de estrés, los BF pueden favorecer el incremento de la cohesividad de la matriz al aumentar la producción de EPS (Shaw y col., 2004).

Todos estos aspectos de la permeabilidad y las propiedades mecánicas del BF influyen directamente en procesos importantes para la vida del BF, como el transporte de oxígeno, de nutrientes, la penetración de compuestos con actividad antimicrobiana o la respuesta frente a fuerzas físicas. Así, por un lado, una matriz muy compacta donde la permeabilidad estuviese muy limitada podría conferir a las células allí alojadas unas características fisiológicas diferentes a las encontradas en BF con una matriz menos compacta. Esa matriz muy compacta podría aportar una resistencia extra a las células que forman parte del BF, especialmente a aquellas situadas en las capas más profundas. Por otro lado, una matriz muy cohesiva resistiría más fácilmente la deformación provocada por ejemplo por la cizalla de un fluido a presión. Todavía hay pocos estudios que profundicen en estos aspectos. Conocer los factores que desencadenan cambios en la matriz y por consiguiente en sus propiedades, sería de gran utilidad a la hora de optimizar el control de los BF en los lugares en los que su aparición compromete la seguridad alimentaria.

1.2.3 Funciones de la matriz

Flemming y Wingender (2010) resumen (tabla 1) el papel de la matriz para la vida del BF. Principalmente, son funciones de soporte (adhesión, agregación, cohesión, retención de agua) y protección, tanto frente a biocidas, antibióticos y cationes como frente a la radiación UV, el sistema inmunitario y la desecación.

Aparte de estas funciones, que podrían llamarse pasivas, algunos autores se cuestionan si habría que considerar otras funciones, que contribuyan de una manera más activa al mantenimiento del BF (Steinberg y Kolodkin-Gal, 2015). Estos autores se refieren a la posibilidad de que los compuestos de la matriz puedan actuar como moduladores de la expresión génica y del comportamiento celular en BF bacterianos.

Algunos estudios muestran cómo, durante la adhesión, concentraciones locales de determinado tipo de EPS en el área ocupada por las bacterias recién adheridas pueden actuar como señal para las células del medio planctónico, favoreciendo de alguna manera que estas células se adhieran y comiencen a su vez a producir EPS. Esto ha sido observado tanto en *P. aeruginosa* para el papel del Pls y el eDNA (Gloag y col., 2013; Irie y col., 2012; Zhao y col., 2013), como en *B. subtilis*, para un determinado exopolisacárido (Elsholz y col., 2014) y para los flagelos (Cairns y col., 2013).

Algunos estudios realizados con *B. subtilis* durante la fase de desarrollo de los BF, sugieren un papel esencial de las EPS tanto en la obtención de una determinada estructura, como en la adquisición de un comportamiento coordinado. Según los autores, los defectos en el comportamiento encontrados en ciertas cepas mutantes, podrían ser explicados por la intervención de las EPS en puntos críticos de regulación de propiedades fundamentales de los BF (Vlamakis y col., 2008).

Tabla 1. Funciones de la matriz de los BF. Adaptada de Flemming y Wingender (2010).

Función	Relevancia para el biofilm	Componente de la matriz
Adhesión	Permite la unión inicial de células planctónicas a sustratos y la adhesión a lo largo del tiempo de todo el conjunto del biofilm	Polisacáridos, proteínas, DNA y moléculas anfifílicas
Agregación	Permite la formación de puentes entre células, la inmovilización temporal de las poblaciones, el reconocimiento célula-célula y el aumento de la densidad celulares	Polisacáridos, proteínas y DNA
Cohesión	Forma una red hidratada que otorga estabilidad mecánica al biofilm y determina su arquitectura, permitiendo la comunicación célula-célula.	Polisacáridos neutros o cargados, proteínas y DNA
Retención de agua	Mantiene un microambiente altamente hidratado alrededor de las células, favoreciendo su tolerancia frente a la desecación	Polisacáridos y posiblemente proteínas
Barrera protectora	Confiere resistencia específica y no específica durante los procesos de infección, tratamientos antimicrobianos	Polisacáridos y proteínas
Sorción de compuestos orgánicos	Permite la acumulación de nutrientes y de xenobióticos (contribuyendo a la detoxificación ambiental)	Polisacáridos cargados o hidrofóbicos
Sorción de compuestos inorgánicos	Promueve la formación de geles de polisacáridos, el intercambio de iones y la acumulación de iones metálicos tóxicos (contribuyendo a la detoxificación ambiental)	Polisacáridos cargados y enzimas
Actividad enzimática	Permite la digestión de macromoléculas exógenas y la degradación de las EPS, dando lugar a la dispersión de células	Proteínas y enzimas
Fuente de nutrientes	Supone una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo	Todos los compuestos
Intercambio de información genética	Facilita la transferencia horizontal de material genético entre células del biofilm	DNA
Intercambio de electrones	Permite la actividad redox dentro de la matriz del biofilm	Proteínas y posiblemente sustancias húmicas
Reserva energética	Almacena exceso de carbono	Polisacáridos
Lugar de unión de enzimas	Supone la acumulación, retención y estabilización de enzimas a través de su interacción con polisacáridos	Polisacáridos y enzimas

Por último, en la fase de dispersión, algunos componentes de las EPS desencadenan procesos de destrucción de la matriz, pudiendo actuar como señalizadores para la dispersión de las células. Por ejemplo, los monómeros en los que se degradan los péptidos con actividad surfactante presentes en la matriz de *S. aureus*, inducen la dispersión del BF (Periasamy y col., 2012).

Con todo y dado que las características de la matriz varían en función de las condiciones del medio (Mayer y col., 1999), sería interesante estudiar estos aspectos de los BF en sus entornos nativos, originales.

1.3 FORMACIÓN

La adhesión de microorganismos a superficies es un proceso complejo que depende de las características de la superficie del sustrato y del propio microorganismo, así como de factores ambientales como temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes y de la regulación genética que esos factores ejercen en las bacterias implicadas (Shi y Zhu, 2009).

La primera vez que se propuso un modelo de formación de BF, se describían 2 etapas, una de aproximación al sustrato y otra de fijación (Marshall y col., 1971). Más

adelante se propuso un modelo de 3 etapas, en función de la distancia de las células al sustrato (Busscher, 1987). En ambos casos la última etapa comprendía la adhesión permanente, ligada a la pérdida de apéndices móviles y a la aparición de nuevas sustancias producidas por las células. Con el desarrollo de la metodología genética y la microscopía, hoy se conocen muchos más detalles de este complejo proceso. En conjunto, la vida de un BF comprende 3 etapas: adhesión, maduración y desprendimiento (Cappitelli y col., 2014). Hay algunos autores, que lo explican en 4 porque dividen en 2 la etapa de adhesión: adhesión reversible y adhesión irreversible (Stoodley y col., 2002). Otros, proponen 5, porque además de diferenciar la adhesión reversible de la irreversible, distinguen entre la formación de la microcolonia y la maduración (Srey y col., 2013). En la figura 4, se muestran los eventos que suceden a lo largo de las etapas de formación del BF.

1.3.1 Adhesión reversible

Todo comienza cuando las células en suspensión en un fluido contactan con un sustrato. Estas células, antes de aproximarse al sustrato pueden estar ya rodeadas de cierta cantidad de EPS aunque sea pequeña. Además, pueden exhibir capacidad de movimiento independiente gracias a flagelos o a pili, como es el caso de *P. aeruginosa* que al aproximarse a un sustrato presenta un tipo de movilidad denominado a saltos o pulsante (*twitching*). También hay una forma de desplazamiento por deslizamiento (*gliding*) descrito en otros microorganismos. Durante esta etapa, las bacterias pueden tener comportamientos específicos entre los que se incluye la vibración (*rolling*), los movimientos trepadores (*creeping*) o la formación de agregados y cordones (Stoodley y col., 2002). Las células planctónicas se aproximan así íntimamente al sustrato, por movimientos de tipo browniano y gravitatorio, hasta que la célula entera es expuesta a fuerzas físicoquímicas inespecíficas, débiles, no-covalentes y de corto alcance, del tipo Van der Waals (dipolo-dipolo o *Keesom*, dipolo-dipolo inducido o *Debye*), ácido-base, electrostáticas e hidrofóbicas. Se han propuesto varias teorías para explicar y predecir la adhesión de microorganismos a sustratos. En todos los casos, estas teorías tienen carencias, debidas a la complejidad química y estructural de la superficie de las bacterias, superior a la de ninguna superficie inerte. Una de ellas es la teoría termodinámica que se basa en la energía libre de las superficies de los microorganismos y del sustrato, y en la tensión superficial del fluido. Otra teoría es la de la estabilidad del estado coloidal o teoría DLVO (nombre que hace referencia a sus 4 autores Derjaguin, Landau, Verwey y Over Beek), que se basa en interacciones Lifshitz-van der Waals y electrostáticas. Una versión extendida de la DLVO añade interacciones ácido-base, que implican la atracción por fuerzas hidrofóbicas y la repulsión por fuerzas hidrofílicas (Bos y col., 1999). Según la teoría termodinámica, la adhesión de los microorganismos a superficies responde a un estado de equilibrio. Basándose en el 2° principio de la termodinámica, habrá adhesión si la variación de la energía libre del sistema es negativa, es decir, si el proceso resulta energéticamente favorable. Sin embargo, como se decía,

todas estas teorías son incompletas por no tener en cuenta a las EPS, cuya producción supone a las células un gasto de energía e incluye el material adherente.

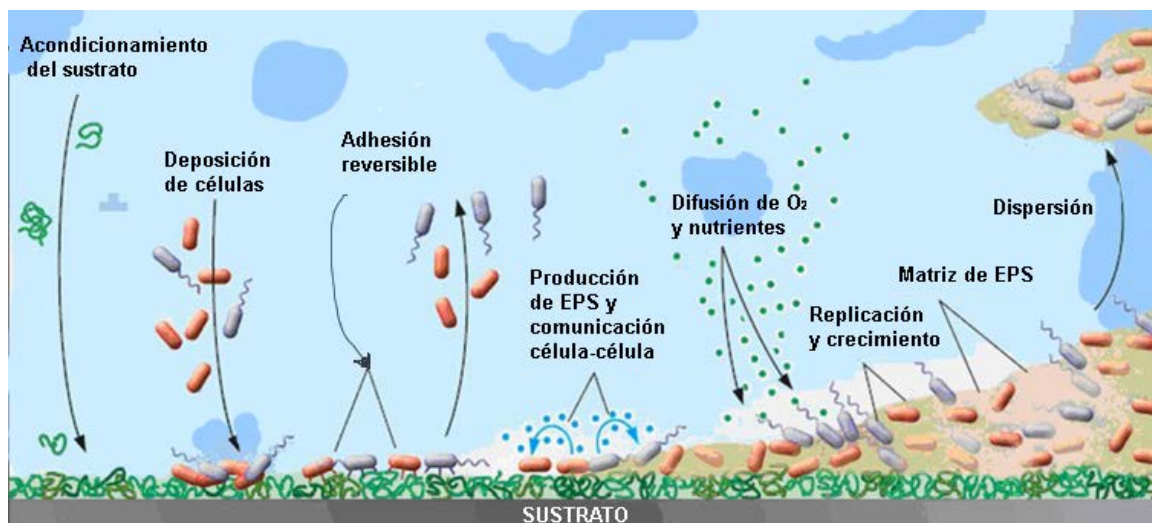


Figura 4. Formación de biofilms y fenómenos relevantes durante el proceso. Adaptado de Breyers y Ratner (2004).

La adhesión es inicialmente reversible, es decir, que las células pueden ser retiradas del sustrato fácilmente con un simple lavado y está condicionada tanto por las propiedades del sustrato como las del fluido y de la superficie de la célula.

En cuanto al sustrato, la topografía, la rugosidad, la carga, la hidrofobicidad y la composición química influyen la adhesión de microorganismos (Song y col., 2015). Diversos autores coinciden en que la adhesión de microorganismos se ve favorecida al incrementar la rugosidad del material o la existencia de pequeñas irregularidades en el acabado, atribuyendo este fenómeno al aumento de la superficie de adhesión y a la aparición de microrrefugios (Palmer y col., 2007). Sin embargo, hay otros autores que no han encontrado relación entre rugosidad y adhesión (Schlisselberg y Yaron, 2013). La carga de la superficie es otro factor influyente y ampliamente estudiado. En un principio, según la teoría DLVO se consideró que al tener los microorganismos frecuentemente carga negativa en su superficie, al aproximarse a sustratos naturales cargados positivamente, las células serían razonablemente atraídas por fuerzas electrostáticas hacia ellos. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos habitualmente probados se adhieren mejor a materiales hidrofóbicos que a hidrofílicos. En este aspecto juega un papel relevante el acondicionamiento de la superficie. Las superficies expuestas a fluidos quedan frecuentemente cubiertas por una película de moléculas orgánicas o inorgánicas procedentes de dicho fluido, como proteínas de la leche, de la carne de cerdo o de ternera en entornos alimentarios e incluso de EPS producido por bacterias allí residentes con anterioridad. Estos compuestos, en definitiva modifican las características químicas de la superficie, favoreciendo (Schlisselberg y Yaron, 2013) o empeorando la adhesión

(Wijman y col., 2007) y pudiendo servir como nutrientes a las células que se instalen en su proximidad.

En cuanto a las células, su hidrofobicidad, la presencia de apéndices, proteínas o polisacáridos de membrana (Cappitelli y col., 2014; Donlan y Costerton, 2002), flagelos (Lemon y col., 2007; Simões y col., 2010) y la producción de EPS están claramente implicados en la adhesión. El nivel de hidrofobicidad de la superficie de las mismas favorece la adhesión y como las fimbrias tienen una elevada proporción de aminoácidos cargados (Rosenberg y Kjelleberg, 1986), contribuyen positivamente a la adhesión, posiblemente porque neutralizan la barrera inicial de repulsión entre la célula y el sustrato (Corpe, 1980). Así estos apéndices y otras proteínas apolares dominan la adhesión a superficies hidrofóbicas, mientras que la presencia de EPS y lipopolisacáridos dominan la adhesión de células a sustratos hidrofílicos. Las células pueden sentir la presencia de una superficie abiótica gracias a sus apéndices (Cappitelli y col., 2014) y también gracias a un aumento de compuestos señal que la mayoría de las bacterias emiten y perciben para su orientación y comunicación (véase QS, en el apartado 1.5 *Regulación y comunicación dentro del biofilm*).

Por último, las condiciones del medio como la temperatura, el pH, la concentración de nutrientes y la velocidad de flujo pueden favorecer en determinadas condiciones la adhesión inicial de células (Donlan, 2002).

1.3.2 Adhesión irreversible

Como se indicaba al principio, en un primer momento la adhesión de las células es reversible, pero cuando comienzan a producir EPS, las uniones inicialmente débiles se hacen más fuertes (del tipo dipolo-dipolo, iónicas y covalentes), mediadas por componentes de esta matriz que ha empezado a formarse, y por adhesinas y receptores específicos localizados en flagelos, fimbrias y pili del microorganismo (Cappitelli y col., 2014; Dunne, 2002). A partir de ese momento la adhesión es firme, es decir, las células no se desprenden con un generoso lavado.

Un estudio reciente contempla estos aspectos de la adhesión inicial como esenciales en la evolución de una comunidad microbiana adherida (Schluter y col., 2014). Según estos autores, una propiedad física como es la adhesión, puede ser una herramienta muy útil para los microorganismos a la hora de competir por el dominio de una superficie. Las células capaces de permanecer adheridas con mayor tenacidad, pueden tener sin embargo la desventaja competitiva de que al quedarse más inmóviles y por consiguiente enterradas en la base del BF, lleguen a aislarse del medio y los nutrientes. Sin embargo, utilizando un modelo con *V. cholerae*, han encontrado cómo este fenómeno permite a las células enterradas "capturar" un mayor territorio en la superficie del sustrato, expulsando fuera de ese espacio a las células competidoras, menos adhesivas. Además, estos autores han demostrado cómo la capacidad para

excretar EPS, favorece la adhesividad de las células y las permite expandirse, desplazando a otras células no capaces de producir EPS.

Aunque el término adhesión irreversible, se empleó en sus orígenes con el objetivo de diferenciar los procesos que acontecían en las etapas iniciales de formación del BF, parece implicar que los BF se encuentran rígidamente pegados a la superficie como si de cemento se tratara. Sin embargo nada de eso tiene que ver con la realidad. Cuando se observa la formación de BF con microscopio a lo largo del tiempo se contempla un escenario muy dinámico, con movimientos de células sueltas sobre la superficie y en el interior de las microcolonias, microcolonias enteras desplazándose sobre la superficie, así como células sueltas procedentes del BF maduro desprendiéndose continuamente. Indican así algunos autores, que convendría revisar el término “irreversible” (Stoodley y col., 2002).

1.3.3 Maduración

Con el paso del tiempo, el BF crece y madura, aumentando el grosor y la complejidad de sus estructuras. Aunque la variabilidad estructural de los BF es muy amplia, tradicionalmente se han descrito formaciones del tipo torres y champiñón con canales y poros (Klausen y col., 2003). Este desarrollo es debido a varios fenómenos. Por un lado, a la multiplicación de las células inicialmente adheridas, por otro al reclutamiento de células del medio y a la acumulación de las EPS producidas, que van empaquetando las células y formando la matriz. Estas EPS permitirán a las células adherirse a la superficie y entre unas y otras (Ghafoor y col., 2011). Lo destacable de este crecimiento es que parece no responder al azar. Para construir estructuras con poros o canales que no deben ser rellenados por biomasa, debe existir un mecanismo programado y regulado que permita alcanzar tal nivel de sofisticación (Hallatschek y col., 2007; Mitri y Foster, 2013).

1.3.4 Desprendimiento

Por último, el ciclo de vida del BF se cierra con el desprendimiento (Sauer y col., 2002). Las células albergadas en el BF (individualmente o agrupadas) lo abandonan y vuelven al medio planctónico pudiendo colonizar nuevos nichos. Este fenómeno, referido también como dispersión, puede ser activo cuando es fruto de la autorregulación fisiológica del BF, o pasivo si es causado por agentes externos.

Actualmente se están estudiando con gran interés las bases biológicas del desprendimiento activo. Todo parece indicar que es el resultado de la entrada en fase estacionaria de las células adheridas y de varios factores del medio tales como cambios en la disponibilidad de nutrientes (O'Toole y col., 2000), descenso en la concentración de oxígeno y otras situaciones de estrés. Dichos cambios, desencadenan la expresión de genes implicados en la dispersión de células (McDougald y col., 2012). Por ejemplo,

Sauer y col. (2004) observaron en un BF de *P. aeruginosa*, cómo un descenso en la fuente de carbono en el medio, provocaba la reaparición del flagelo, inhibía los genes responsables de los pili y promovía la dispersión del BF.

Otros autores han descrito que el aumento de la concentración de moléculas inductoras, conlleva la activación y liberación de enzimas degradantes de polímeros que debilitan la matriz y provocan el desprendimiento de las células del BF. Es el caso de Boyd y Chakrabarty (1995), que mostraron cómo la sobreexpresión de alginato liasa causaba la degradación de alginato (principal polímero presente en la matriz de BF de *P. aeruginosa*) y producía BF fácilmente desprendibles con un suave lavado. Estas enzimas degradadoras de compuestos de la matriz (polisacaridasas y liasas específicas), parecen ser también inducidas por señales que se activan cuando la densidad celular alcanza niveles elevados en una microcolonia.

En cuanto al desprendimiento pasivo, normalmente causado por fuerzas físicas, ha sido estudiado con más detalle. Puede ocurrir de 3 maneras: erosión, abrasión y *sloughing* (desmoronamiento). El primero se refiere a la pérdida continua de pequeños fragmentos del BF; el segundo a la pérdida de pequeños fragmentos del BF por la colisión con partículas del fluido y por último el desmoronamiento o *sloughing*, que es una retirada rápida y masiva de grandes fragmentos de BF. La manera en que ocurre el desprendimiento puede tener relevancia en ciertos entornos, pues es la principal causa de contaminación o transferencia de un microorganismo adherido al fluido o al sólido en contacto. Cuando ha sido un desprendimiento fruto del propio crecimiento del BF (activo), estas células adquieren un perfil típico de células planctónicas. En cambio, si ha sido por causa de la erosión o la abrasión (pasivo), las células mantienen, al menos en parte, su fenotipo BF (Donlan, 2002).

1.3.5 Heterogeneidad de la comunidad adherida

A lo largo de su desarrollo en los BF, las células experimentan cambios en su morfología y pautas de comportamiento, como consecuencia de su diferenciación fenotípica que es específica y cambiante, expresándose en cada fase del desarrollo un fenotipo distinto (Stoodley y col., 2002). De hecho, está descrito que se producen cambios en los niveles de expresión proteica entre las distintas etapas de formación del BF, siendo la diferencia media en el conjunto de proteínas propias de cada una de ellas del 35% (Sauer y col., 2002).

Esta diferenciación de las células comienza en los primeros instantes (Davies y Geesey, 1995). De hecho, Karatan y Watnick (2009), observaron que nada más aproximarse las células al sustrato, al contactar con el flagelo se desencadenaba la expresión de genes implicados en la formación de BF y se inhibía la síntesis del flagelo. Parece pues que este proceso de diferenciación está inducido por las características fisicoquímicas de la superficie externa de las células y sus interacciones iniciales con el

sustrato, formando parte de complejos patrones de regulación (Prigent-Combaret y col., 1999).

Dado que los procesos de adhesión, maduración y dispersión no ocurren de una forma sincronizada en todo el BF sino que más bien se desarrollan a distinta velocidad en zonas localizadas, en cada momento y lugar de una superficie se encuentran células adheridas en diferentes estados de desarrollo (Stoodley y col., 2002) y por tanto, con diferentes perfiles fenotípicos. Es por eso que se habla de heterogeneidad fenotípica dentro del BF.

1.4 ESTRUCTURA

En ocasiones los BF son formaciones suficientemente gruesas como para ser visibles por el ojo humano. (Stoodley y col., 2002). Hasta hace unos años, los BF se consideraban agrupaciones de células carentes de estructura. Sin embargo, los avances en el campo de la microscopía, y en concreto la aplicación de la CLSM para el estudio de los BF, ha arrojado una cantidad importante de información. Esta técnica permite visualizar muestras totalmente hidratadas y ello ha hecho posible descubrir su estructura tridimensional. Además, acoplar esta técnica con la proteómica y la genómica, así como con la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y otras técnicas, ha permitido elucidar la importancia que para los BF tiene su propia estructura, llegando algunos autores a ver una relación estrecha de la estructura con la función y el comportamiento (Boyle, 2007).

La unidad básica estructural del BF es la microcolonia (Donlan, 2002; Stoodley y col., 2002). Como ya se mencionaba con anterioridad, el desarrollo de estas microcolonias no ocurre aleatoriamente sino respondiendo a sistemas complejos de comunicación, para en última instancia acabar adquiriendo una conformación espacial caracterizada por canales, poros y huecos, por los que transcurren nutrientes, oxígeno, agua y otras sustancias que mantienen aprovisionadas y drenadas a las células individuales de la comunidad (Boyle, 2007; Stoodley y col., 2002). Aunque estos canales permitan el intercambio de sustancias, la difusión en las zonas más profundas está obviamente limitada. De modo que en el caso del oxígeno, se observan zonas mal abastecidas en el centro de los BF donde proliferan anaerobios. Es precisamente la difusión restringida uno de los fenómenos que proporciona a las células albergadas en el BF una protección extra frente a circunstancias adversas del entorno, como por ejemplo la exposición a sustancias antimicrobianas. De este aspecto se hablará más adelante.

1.4.1 Consecuencias de la estructura

Precisamente la estructura característica de los BF, que supone el apilamiento cementado de capas de células, condiciona la aparición de microgradientes de oxígeno, nutrientes y productos finales del metabolismo, así como de diversos productos procedentes del exterior (Haussler y Fuqua, 2013; Kim y col., 2014; Serra y Hengge,

2014; Stewart y Franklin, 2008). Este aspecto de la estructura de los BF, determina el grado de heterogeneidad celular típico de la vida en los BF, que condiciona la amplia variabilidad fenotípica encontrada en ellos.

Los gradientes químicos que se crean en la biomasa adherida afectan además a la concentración local de nutrientes y oxígeno, de productos de desecho y de moléculas señal, pudiendo superponerse o cruzarse, dando como resultado la formación de microambientes únicos (Stewart y Franklin, 2008) repartidos por todo el BF. La respuesta adaptativa específica de cada grupo de células a las condiciones locales concretas, supone la aparición de diferencias en los comportamientos metabólicos, en las respuestas frente a estrés y frente a otras actividades biológicas en el conjunto de células del BF. Según algunos autores, estas diferencias están sujetas también a procesos propios de la selección natural (Kim y col., 2014).

Los fuertes gradientes de nutrientes hacen que en zonas ricas, las células se dividan a mayor velocidad que las alojadas en el centro de las colonias y alejadas de la fuente de recursos (Mitri y Foster, 2013; Nadell y col., 2010; Schluter y Foster, 2012; Serra y col., 2013). Estas últimas entran así, según algunos autores, en un estado "durmiente", esto es, una especie de fase estacionaria en la que la población no crece sino que hace uso de los escasos recursos de los que dispone para mantenerse y sobrevivir (Serra y Hengge, 2014). En busca de esta supervivencia, algunos autores indican que esas células logran hacerse resistentes a multitud de situaciones de estrés (Serra y col., 2013).

En un estudio reciente llevado a cabo por Serra y col. (2013), se obtuvieron imágenes de elevada resolución a nivel celular de los diferentes estratos presentes en las macrocolonias de un BF de *E. coli* obtenido sobre placas de agar. Utilizando SEM de alta resolución, vieron cómo en las zonas próximas a la fuente de nutrientes (en su caso, los finos bordes y la parte inferior de la macrocolonia en contacto con el agar), la morfología era típica de células en fase postexponencial: conservan su flagelo, están en crecimiento, y tienen forma alargada. Sin embargo, en la zona más separada de la fuente de nutrientes (parte superior de la macrocolonia), las células exhibían un comportamiento característico de fase estacionaria: sin flagelo, son pequeñas y ovaladas, no crecen apenas y comienzan a generar fibras amiloides onduladas que las empaquetan. La parte central de la macrocolonia, representaba una zona de transición, donde células pequeñas en camino hacia la fase estacionaria, aparecían mezcladas con células algo más alargadas. Aunque con un nivel de resolución de las imágenes inferior, otros autores (An y Parsek, 2007; Stewart y Franklin, 2008) compararon también el comportamiento entre células creciendo en los bordes externos de las microcolonias formando torres de tipo champiñón en contacto con el medio, y el observable en el interior, donde las células experimentaban un severo grado de escasez de nutrientes.

Por otro lado, Kim y col. (2014), han analizado mediante CLSM y un modelo con *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, el comportamiento de las diferentes subpoblaciones dentro del BF, estableciendo que ante esta situación de escasez de recursos en las capas alejadas del medio, lo realmente sorprendente es que algunas células inviertan sus escasos recursos en expresar un nuevo fenotipo (productor de polímeros típicos de las EPS) con el único objetivo de moverse hacia el borde próximo a la fuente de nutrientes dejando atrás a su competidor. Según estos autores, este fenómeno evolutivo no ocurre en busca de una tasa de crecimiento superior sino para optimizar su habilidad para expandirse como comunidad, optando por la colonización de un nuevo sustrato.

Otros autores han propuesto otro posible comportamiento ante esta misma situación. Según Liu y col. (2015), debido a la estructura adquirida por los BF, las células que quedan adheridas en la base (alejadas de la fuente de alimentación) cubiertas por repetidas capas de células, experimentan por un lado una falta de nutrientes, y por otro, una protección extra frente a situaciones de estrés. Surge así un paradójico conflicto. Las células que las protegen las “matan de hambre”. Estos autores han observado que para resolverlo lo que hace la comunidad es oscilar el ritmo de crecimiento. Cuando la microcolonia alcanza un determinado tamaño (en su caso fue $580 \pm 85 \mu\text{m}$ de diámetro medio) detiene su crecimiento durante cierto tiempo, permitiendo el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las células alojadas en las capas más profundas (en sus experimentos, más de un día).

En conclusión, la respuesta de los microorganismos albergados en el BF a los microambientes locales que se crean en él, puede ser de 3 maneras: alterando su expresión génica o su comportamiento fisiológico para adaptarse a esa condición particular; favoreciendo el crecimiento de una subpoblación determinada que está mejor adaptada a esa situación; o seleccionando cepas mutantes capaces de sobrevivir a tales condiciones (Stewart y Franklin, 2008).

1.4.2 Factores que influyen en la estructura

La arquitectura de un BF está sujeta a multitud de factores como la tasa de crecimiento, el tipo de microorganismo, su estado fisiológico, las señales celulares, el sustrato de adhesión, la producción de EPS, la temperatura del medio y la presencia de unos u otros microorganismos. De hecho, algunos autores establecen que cada BF es único, además de que hay grandes diferencias en cuanto a la estructura entre los modelos de BF estudiados *in vitro* y los que se desarrollan *in vivo* (Bjarnsholt y col., 2013).

Por ejemplo, en BF bacterianos integrados por más de una especie, algunos autores han descrito patrones de distribución espacial concretos, en función de las correspondientes necesidades o aptitudes metabólicas. De hecho, en estos BF mixtos, los diversos microorganismos que conforman el BF pueden en muchos casos cooperar,

resultando más eficaces que sus homólogos creciendo en suspensión (Elias y Banin, 2012; West y col., 2007).

Bridier y col. (2012) demostraron mediante CLSM, que una cepa resistente de *B. subtilis* ND_{medical}, aislada de ambientes hospitalarios, era capaz de proteger las células de *S. aureus* frente a un tratamiento con ácido peracético. Los autores atribuyeron este hecho a que las células de *S. aureus* se localizaban en las capas profundas de los BF mixtos formados por estas 2 especies.

En esta misma línea, Almeida y col. (2011), utilizando sondas de hibridación y CLSM, observaron la distribución espacial de *Salmonella enterica*, *E. coli* y *Lm* en un BF multiespecie. Estos autores describieron una primera capa próxima al sustrato de adhesión, ocupada por *Lm* y *S. enterica*. Esta capa aparecía cubierta por una segunda, de mayor grosor, ocupada íntegramente por *E. coli*. Los autores concluyeron que *E. coli* era la especie dominante por su mayor tasa de crecimiento y su mayor capacidad para producir EPS en comparación con *Lm* y *S. enterica*. De esta manera, posiblemente, las células de *E. coli* que llegaban a la superficie lograban adherirse más rápidamente y comenzaban a proliferar formando microcolonias, enterrando a las células de *S. enterica* y *Lm* que por ser más lentas en su adhesión y maduración quedaban “atrapadas” en el fondo del BF. El hecho de que la biomasa (matriz+células) de *E. coli* fuera cubriendo a las células de las otras especies, iba limitando la difusión de sustancias hasta esas primeras capas. En consecuencia, reducidas concentraciones de oxígeno así como de nutrientes iban dificultando la proliferación de *Lm* y *S. enterica*.

Otro estudio que también evaluó la distribución espacial de *Lm* en un BF mixto, en este caso con *Pf*, obtuvo resultados similares. Se observó que *Lm* tendía a localizarse precisamente en las capas más profundas de la estructura, alejadas del medio (Puga y col., 2014). Este hecho, podría ser reflejo de los microgradientes que se han explicado anteriormente, que condicionarían la selección de *Lm* en ese entorno concreto, quizá, por ser capaz esta bacteria de tolerar menores tasas de oxígeno en comparación con *Pf*, además de por su menor velocidad de adhesión y desarrollo de BF. Las consecuencias de esta localización preferencial de *Lm* pueden ser varias. Por ejemplo, podría explicar el hecho de que *Lm* y otros patógenos sean más resistentes a los tratamientos de limpieza y desinfección (Sanchez-Vizueté y col., 2015). El hecho de que en la industria alimentaria lo más probable es que este tipo de bacterias patógenas se encuentren formando parte de BF mixtos, es especialmente relevante.

La temperatura es otro de los factores que condiciona la estructura de los BF. En concreto, el estrés por el frío puede modificar en mayor o menor medida la estructura de los BF y por tanto modificar la penetración de compuestos antimicrobianos. Al igual que ocurre con el estrés por frío, posiblemente otras condiciones de estrés puedan afectar a la estructura. El hecho de que en la industria alimentaria se den varios de estos

factores de estrés (el frío propio de las plantas de procesado, la exposición a continuos ciclos de limpieza y desinfección, la escasez de nutrientes o la desecación), es un aspecto a tener muy en cuenta a la hora de diseñar herramientas destinadas al control de los BF en dichos entornos, pues en definitiva estos cambios pueden contribuir a una mayor resistencia de las células adheridas.

1.4.3 Algunas excepciones. El caso de *Listeria monocytogenes*

Uno de los factores que puede condicionar la estructura desarrollada por el BF es el tipo de microorganismo, tanto a nivel de especie como de cepa. Algunos autores llaman la atención sobre las diferencias estructurales en el caso de *Lm*, bacteria patógena de gran interés para la industria alimentaria. Aunque su capacidad para formar BF en cultivo puro en condiciones experimentales, ha sido extensamente estudiada (Moretro y Langsrud, 2004; Nilsson y col., 2011), su estructura dista mucho de la más frecuentemente descrita de tipo champiñón.

Briandet y col. (2008), utilizando CLSM, evaluaron el crecimiento en BF de *Lm* AR009 bajo condiciones de flujo estático y dinámico. Sus resultados mostraron no solo diferencias con respecto a la estructura típica de los BF, sino diferencias en función del tipo de flujo. Bajo condiciones estáticas, tras 48h de incubación a 25°C, obtuvieron un BF delgado y uniforme, formado por varias capas de células que cubrían homogéneamente la superficie. Sin embargo, cuando se formaban bajo condiciones de flujo dinámico, tras 48h, los BF obtenidos se caracterizaban por la aparición de colonias esféricas y pequeñas, unidas por una red de cadenas entrelazadas.

A una conclusión similar sobre la estructura de los BF de *Lm* llegaron Guilbaud y col. (2015). La morfología de las 96 cepas de *Lm* que evaluaron mediante CLSM fue desde simples estructuras finas, lisas y homogéneas hasta un complejo patrón de formaciones en panal de abeja, con huecos vacíos y acumulaciones de células y eDNA.

1.4.4 Otros aspectos de la estructura

Como comentábamos al final del apartado 1.3.2 *Adhesión irreversible*, la estructura de los BF no es inmóvil, sino que puede desplazarse por las superficies. Quizás, en este fenómeno estén implicados agregados moleculares del tipo de los pili, que uniéndose a 2 o más células podrían acortarse y alargarse, provocando el movimiento de esas células a un sitio u otro. Además, estas estructuras del tipo pili, podrían también explicar el elevado nivel de transferencia de genes y plásmidos entre las células del BF. Parece probable que la posición y las relaciones espaciales entre los componentes de un BF no sea un proceso al azar sino que esté mediado, al menos en parte, por moléculas señal y algún tipo de mecanismo de orientación. Además de este movimiento de masas adheridas, recientemente se ha descrito otro posible movimiento en las proximidades o ya dentro de la estructura de los BF. Se trata del abordaje de los BF por parte de células

planctónicas (Houry y col., 2012), fenómeno que podría explicar algunos patrones de distribución espacial encontrados en los BF de más de una especie.

1.5 REGULACIÓN. COMUNICACIÓN DENTRO DEL BIOFILM

Las bacterias, lejos de ser criaturas solitarias, a cierta concentración pueden actuar como si de organismos coloniales se tratara. Poco a poco se va conociendo que utilizan complejos mecanismos de comunicación y de interacción intercelular que les permiten sacar el máximo partido a los recursos de los que disponen, logrando la adaptación a las situaciones del entorno, para alcanzar en definitiva un nivel máximo de supervivencia. Las señales externas pueden inducir patrones de comportamiento coordinados y adaptados a cada situación al modular la expresión de su propia dotación genética (Nnous y col., 2009).

1.5.1 Quorum Sensing. El lenguaje de las bacterias

1.5.1.1 *Concepto*

Para algunos autores, los BF bacterianos maduros presentan tal grado de especialización y coordinación, que se aproximan a algunos organismos pluricelulares sencillos (Nnous y col., 2009; Stoodley y col., 2002). Una herramienta que parece clave para poder adquirir tal grado de coordinación entre los organismos individuales que conforman el BF es precisamente los sistemas de comunicación intercelular, referidos como QS.

El QS es un sistema de comunicación química mediante el cual las bacterias producen y detectan determinadas moléculas señal y coordinan su comportamiento en función de su densidad celular. Esto les permite estimar la abundancia de células vecinas y regular distintos aspectos de su fisiología. Cuando la población en el BF supera un nivel determinado, estas señales alcanzan la concentración umbral requerida para favorecer o inhibir la expresión de los genes en cuestión y modular así la expresión génica que desencadenará un comportamiento específico. Estos mecanismos de comunicación, permiten a las bacterias coordinarse y adaptarse al medio llevando a cabo una respuesta unificada, beneficiosa para toda la población. En definitiva, el QS favorece el acceso a nutrientes, a nichos más favorables, y fortalece la competitividad frente a otras bacterias y frente a situaciones de estrés ambiental. Hay también señales de comunicación entre bacterias de especies diferentes. Algunos ejemplos de procesos que están modulados por QS en las bacterias son la esporulación, la simbiosis, la síntesis de péptidos con poder antimicrobiano, la regulación de la virulencia y la formación de BF (Nnous y col., 2009).

1.5.1.2 *Sistemas*

El estudio de los sistemas de QS presentes en las bacterias, ha permitido identificar algunos compuestos claramente implicados en estos mecanismos. Aunque algunos

autores contemplan más (Nnous y col., 2009), principalmente se distinguen 3 mecanismos (Waters y Bassler, 2005). Uno es propio de bacterias Gram negativas, otro de Gram positivas y el tercero es común en ambas.

En las bacterias Gram negativas los sistemas de QS dependen de proteínas homólogas a las del sistema regulatorio LuxI-LuxR de *Vibrio fischeri* (Miller y Bassler, 2001). Una proteína homóloga a LuxI controla la síntesis de los compuestos autoinductores, en este caso, homoserín lactonas-N-acetiladas (AHL), que actúan como autoinductor-1 (AI-1) para uso de una especie o para especies próximas. Estos compuestos consisten en un anillo de homoserín lactona con un grupo acetil de longitud variable y específica de especie. La síntesis de este compuesto ocurre dentro de la célula y posteriormente es secretado o difundido al medio extracelular. Conforme aumenta la densidad celular aumenta la concentración de AHL en el medio. Alcanzado el nivel umbral, las AHL vuelven a entrar en las células y allí se unen a la proteína receptora, homóloga a LuxR. Este complejo LuxR-AHL activará o inhibirá la expresión de determinados genes diana (Miller y Bassler, 2001).

En el caso de las bacterias Gram positivas, los compuestos autoinductores son unos péptidos secretados al medio extracelular tras ser traducidos como péptidos modificados. Como ocurría con las AHL, la concentración de péptidos aumentará al aumentar la población. Pero la gran diferencia es que alcanzado el nivel umbral, en este caso los péptidos no regresan al interior de la célula sino que se unen a un receptor de membrana. Así, los péptidos son reconocidos por un sistema de sensores de quinasas de 2 componentes que dan lugar a una serie de reacciones de fosforilación/defosforilación. Al final, el regulador de la respuesta es fosforilado, quedando activado. Una vez activado, se une al DNA modulando la transcripción del gen diana controlado por el sistema de QS (Miller y Bassler, 2001).

Se ha descrito un tercer sistema utilizado tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas. A este sistema se le ha denominado autoinductor 2 (AI-2). El compuesto AI-2 es producto de la enzima LuxS, que también interviene en la ruta metabólica de la S-adenosilmetionina (McDougald y col., 2007; Vendeville y col., 2005). Esta doble función de la enzima LuxS, hace necesario un diseño específico de los experimentos que pretenden estudiar el papel de AI-2 en sistemas de QS (*i.e.* complementar con el gen de LuxS y con AI-2 purificado) (Hardie y col., 2003; McDougald y col., 2012).

Algunas bacterias implicadas en enfermedades de transmisión alimentaria como *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y otras especies Gram negativas, cuentan con otro sistema de QS. Se trata del sistema de señalización autoinductor-3/epinefrina/norepinefrina (AI-3/epi/norepi) (Walters y Sperandio, 2006). Siendo la epinefrina y la norepinefrina hormonas presentes en los mamíferos, probablemente

este sistema suponga un mecanismo de comunicación entre las bacterias y las células del hospedador.

Otros tipos de moléculas señal han sido descritos. Entre ellos se encuentran el indol, 3,4-dihidroxi-2-heptilquinalona; las butirolactonas; el ácido metil éster 3-hidroxi palmítico y los dipéptidos cíclicos (Lee y col., 2007; Walters y Sperandio, 2006).

1.5.1.3 Quorum Sensing en bacterias patógenas de transmisión alimentaria

En el uso de cepas con mutaciones en los genes implicados en la síntesis de moléculas señal, el análisis de las diferencias en la expresión génica en los BF y de sus consecuencias, puede aportar una información valiosa sobre el papel del QS en la formación de BF. Esta información será de gran utilidad para diseñar estrategias de control de los BF tanto en entornos alimentarios como clínicos. El avance del conocimiento en QS está sin embargo aún dificultado por la falta de uniformidad en los modelos de estudio utilizados y por las grandes diferencias de respuesta encontradas entre cepas (Brackman y Coenye, 2015). Además, aún hay muchas dudas sin resolver, como por ejemplo el papel del QS en la virulencia y resistencia a antimicrobianos de los BF.

Reeser y col. (2007), por ejemplo, demostraron que los BF formados por una cepa de *Campylobacter jejuni* mutada para el gen *luxS*, que codifica la enzima LuxS implicada en la síntesis de AI-2, fueron $3,2 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ menores en comparación con los formados por la cepa salvaje. La adición de sobrenadantes de la cepa salvaje crecida durante 24h, suponía un incremento en el BF formado. Sin embargo, no demostraron en el sobrenadante la presencia de AI-2 ni tampoco probaron a añadir AI-2 purificado. Por tanto, no pudieron establecer con claridad si el efecto negativo de la falta de *luxS*, era debido a la ausencia de AI-2 o a un defecto en el metabolismo celular. En un estudio similar hecho con *Helicobacter pylori*, los BF de las cepas mutantes fueron 3 veces más voluminosos que los de las cepas salvajes (Cole y col., 2004). Es decir, que aparentemente el gen *luxS* en este caso ejercía un control negativo sobre la formación del BF.

En el caso de *Lm*, bacteria Gram positiva, aún no se ha detectado el sistema de péptidos que se describió anteriormente para este tipo de bacterias. Sin embargo, investigaciones recientes indican la presencia, en *Lm*, de un sistema regulador también mediado por péptidos, en el que está implicado el gen regulador accesorio (*agr*). Hay 4 genes localizados en el operón de *agr*: *agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*. Rieu y col. (2007) observaron que mutantes sin los genes *agrA* y *agrD* obtuvieron un 62% menos de células adheridas en cupones de vidrio con respecto a la cepa salvaje. El mismo experimento realizado sobre poliestireno, condujo a un 33% menos de células adheridas durante las primeras 24h de incubación, pese a no encontrarse diferencias tras 48 y 72h. Posiblemente estas diferencias fueran debidas a una reducción en la velocidad de

adhesión. En cuanto al sistema AI-2, presente tanto en Gram positivas como Gram negativas, *Lm* puede producir las señales, pero no hay evidencias experimentales de que tenga los receptores correspondientes. Así, este sistema parece no ser utilizado por *Lm* como herramienta de comunicación (Garmyn y col., 2009).

Muchos estudios se han dedicado al análisis del QS en *E. coli*. Algunos de ellos, contradictorios en cuanto al papel del AI-2. González Barrios y col. (2006) por ejemplo, han encontrado que la adición de AI-2 enzimáticamente sintetizado favorece la movilidad celular y la formación de BF de *E. coli*. Yoon y Sofos (2008) sin embargo, no vieron diferencias entre una cepa de *E. coli* O157:H7 productora de AI-2 y su homóloga no productora. Por otro lado, el papel del indol como molécula señal en *E. coli* parece ser inhibitorio; como la delección de *sdiA* también inhibe la formación de BF, Lee y col. (2007), propusieron que el indol se une a la proteína SdiA, inhibiendo de esta manera la formación de BF.

Salmonella spp., cuenta también con el gen *sdiA*, pero no puede sintetizar AHL (Walters y Sperandio, 2006). El papel del sistema LuxS/AI-2, aún no está claro. A pesar de que se ha descrito que cepas *luxS* negativas son incapaces de formar BF maduro, el defecto se corrige al complementar con gen *luxS*. Sin embargo, el BF no se restablece al añadir un compuesto activo homólogo al AI-2 (Yoon y Sofos, 2008).

En *S. aureus*, parecen estar presentes tanto el sistema LuxS/AI-2 como un sistema basado en péptidos autoinducidos (AIP). El papel de cada uno de los sistemas está aún por determinar.

Todavía no está resuelto el papel del QS en la contaminación de los alimentos, en la formación de BF en las plantas de procesado, o su implicación en la producción de toxinas en las bacterias patógenas presentes en los alimentos.

1.5.2 Otros sistemas de regulación

Aparte del QS, otras moléculas tradicionalmente implicadas en procesos de comunicación entre bacterias, tienen un papel en la formación de BF. Es el caso del di guanilato cíclico (c-di-GMP), los fragmentos de RNA de bajo peso molecular (sRNA, de *small* RNA), o el eDNA. En cuanto al c-di-GMP es un segundo mensajero presente prácticamente en todas las eubacterias, que regula una amplia variedad de funciones, entre ellas el tránsito entre células adheridas y planctónicas (Yildiz, 2008). En algunas bacterias, niveles altos de esta molécula se han asociado con el modo de vida adherido, de hecho se cree que su aumento intracelular responde a que las bacterias “sienten” las superficies, mientras que niveles bajos se han relacionado como una señal para abandonar el modo de vida BF y dispersarse, de ahí su posible papel en la virulencia de patógenos (Caly y col., 2015).

El papel de los sRNA (fragmentos de longitud media entre 25-500 nucleótidos) en la regulación post-transcripcional de bacterias está tomando mucha relevancia. Su síntesis se induce como respuesta a cambios ambientales. Aparentemente, son menos costosos de producir por parte de las células que los reguladores proteicos, lo que permite respuestas rápidas frente a estímulos externos (Beisel y Storz, 2010). Recientemente, Chambers y Sauer (2013) han revisado el papel de los sRNA en procesos tales como el control de la transición al modo de vida adherido, el QS y la respuesta al estrés.

2 BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

2.1 IMPACTO DE LOS BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La formación de BF en las instalaciones alimentarias en la mayoría de los casos da lugar a problemas, ya sean de tipo tecnológico o higiénico sanitario, es decir, para la salud pública. En el caso de los tecnológicos, pueden suponer un problema en cuanto a la fiabilidad en las prestaciones del equipo, o un daño a los equipos, lo que con frecuencia provoca fallos en los procesos ocasionando pérdidas de eficacia y en última instancia, pérdidas económicas. Otras veces la presencia de BF comporta defectos de calidad, si alojan microorganismos deteriorativos.

El impacto higiénico sanitario es debido a la proliferación y el riesgo de transferencia de microorganismos a los alimentos. Microorganismos que como se apuntó anteriormente, están muy adaptados a condiciones de estrés. Esto supone pérdidas de calidad en el producto y por tanto pérdidas económicas. Pero lo más importante es el riesgo para la salud pública, si se trata de microorganismos patógenos.

Hay que tener en cuenta que en los mismos BF, se integran poblaciones multiespecie en los que unos microorganismos afectan al desarrollo de otros. Por el otro lado, un problema tecnológico puede desencadenar otro sanitario y viceversa. Es el caso de la falta de mantenimiento de los equipos, un fallo tecnológico provocado por un BF puede favorecer la aparición y transferencia de microorganismos al producto final.

La transferencia de microorganismos en BF a los alimentos, puede suceder de 3 maneras diferentes: del aire a los alimentos a través de aerosoles; de superficies a alimentos fluidos; o de superficies a alimentos sólidos, en ambos casos a través del contacto con dicha superficie (Pérez-Rodríguez y col., 2008).

2.2 LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: UN LUGAR PRIVILEGIADO PARA LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

Los humanos competimos con los microorganismos por los mismos nutrientes y la industria alimentaria es un escenario de batalla donde ambas partes empleamos nuestras mejores armas. Las usadas por los humanos tienen las limitaciones que impone

la necesidad de que los alimentos sean aceptables, seguros y a un precio que permita el abastecimiento de la población. La formación de BF es una de las armas que ponen en juego los microorganismos. El diseño de las instalaciones y equipos, el acceso a los nutrientes, la exposición continua a biocidas y la adaptación al estrés de los microorganismos son parte de la guerra (Srey y col., 2013).

El diseño de plantas y equipos, es en ocasiones poco higiénico. Aparecen zonas de difícil acceso para la limpieza que favorecen la acumulación de materia orgánica. Muchas plantas se someten a ampliaciones posteriores que pueden entorpecer las labores de limpieza (dejando poco espacio para el paso) e incluso contribuir a un mayor riesgo de contaminación (*i.e.* líneas de procesamiento que se cruzan para adaptarse al espacio disponible). También, la falta de mantenimiento de los equipos puede llevar a situaciones de riesgo. Acosados por las técnicas de preservación de alimentos y las prácticas higiénicas, los microorganismos pueden encontrar nichos donde refugiarse; los mejores son aquellos donde también se acumula materia orgánica después de la limpieza y desinfección (Ferreira y col., 2014). Algunos ejemplos son los desagües, las hendiduras o muescas en un rodillo, los poros de los suelos, etc. Como se verá más adelante, estas zonas dentro de la industria alimentaria tienen una fuerte repercusión en la persistencia, esto es, el establecimiento de bacterias en las instalaciones por largos periodos de tiempo.

La presencia de nutrientes, supone obviamente una condición favorable (Brown y col., 2014). En las plantas de procesamiento, durante la producción, están presentes nutrientes que proceden de la materia prima y los productos elaborados. Durante las pausas de la producción, por ejemplo para la limpieza y desinfección, la presencia de nutrientes desciende. Esto supone, por un lado, la aparición de superficies acondicionadas y por otro, la fluctuación de niveles altos y bajos de nutrientes. En el primer caso, como se explicó en el apartado 1.3.1 *Adhesión reversible*, el acondicionamiento de una superficie puede contribuir a la interacción de los microorganismos con la misma y por eso la composición de la materia prima es un factor muy importante. Por ejemplo, los geles de almidón al secarse se adhieren y hacen más cohesiva la superficie. En cuanto a las fluctuaciones de nutrientes, la escasez supone un mecanismo de estrés al que las bacterias se adaptan para su supervivencia.

La exposición continuada a biocidas es uno de los problemas más serios. Los microorganismos de la planta están muy adaptados a los biocidas que se usan (Araújo y col., 2011) y en definitiva a las condiciones de estrés que allí se dan. Algunos de estos microorganismos alojados en BF, pueden hacerse persistentes en la planta y comportarse como reservorios de patógenos (Habimana y col., 2010) transfiriéndose a los alimentos antes, durante o después del procesamiento.

Por último, la adaptación al estrés. La exposición continuada a condiciones estresantes de las células: baja temperaturas, biocidas, fluctuaciones de nutrientes, etc. hace que estas se adapten no solo a esas condiciones difíciles sino a otras que se les puedan presentar, ya que, la resistencia que se adquiere frente a un determinado tipo de estrés puede conducir a una protección cruzada frente a otros (Durack y col., 2013; Wesche y col., 2009).

2.3 INSTALACIONES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La presencia de microorganismos formando BF en la industria alimentaria es una clara fuente de contaminación. La posibilidad de que estos microorganismos sean patógenos es una realidad que no puede obviarse y que compromete la seguridad alimentaria. Desde siempre, la salud pública ha estado amenazada por la existencia de microorganismos capaces de provocar enfermedades de transmisión alimentaria. De la misma manera que en la actualidad se ha reconocido que los BF son una fuente importante de infecciones para el ser humano, responsables del 60% de las infecciones (Shunmugaperumal, 2010), también se reconocen los BF como fuente de enfermedades de transmisión alimentaria (Giaouris y col., 2014).

No solo los BF en equipos y superficies, abiertas o cerradas, pueden convertirse en reservorios de microorganismos, también los propios alimentos, los empleados y todo el pequeño equipamiento puede ser fuente de una contaminación cruzada.

A medida que se comercializan más alimentos procesados y que los periodos de conservación se alargan, y con el objetivo de poder establecer estrategias de prevención y control, es necesario estudiar a fondo los factores que están interviniendo en dicho proceso. Es un trabajo difícil por la enorme variedad de situaciones planteadas, no solo a nivel de cada tipo de industria sino por las diferentes características de cada producto y de los equipos, sin olvidar la fuerte influencia que las características intrínsecas de cada cepa tienen en el proceso de formación de BF.

2.3.1 Equipos presentes en la industria alimentaria

El tipo de equipos presente en una instalación alimentaria condiciona en gran medida las características de la suciedad que se va a producir. La suciedad supone una fuente de nutrientes y por eso es importante tener en cuenta este aspecto. Independientemente del tipo de planta de procesamiento hay una serie de equipos comunes a todas. En primer lugar, en general, pueden encontrarse torres de refrigeración o de enfriamiento. Se trata de equipos que se utilizan para disipar el calor de condensación que se origina en las instalaciones frigoríficas de compresión mecánica. Es decir, aquellas instalaciones que producen el frío artificial y lo sirven a las cámaras y salas donde los alimentos se refrigeran, conservan, despiezan y envasan así como a los vehículos refrigerados donde se transporta el alimento desde el almacenista o desde el matadero hasta el punto de

venta. En segundo lugar, intercambiadores de calor, por los que pasa un fluido para modificar la temperatura. Y por último, depósitos o tanques de almacenamiento y tuberías, que normalmente forman circuitos cerrados por los que transcurre agua, residuos o alimentos fluidos.

Además de estos equipos comunes, según el tipo de materia prima que se procesa en la instalación habrá equipos específicos. Por ejemplo, los atomizadores utilizados en la industria láctea, las loncheadoras, evisceradoras, picadoras en la industria cárnica y de pescado, o las cortadoras en la industria vegetal, entre otros.

En cuanto a los equipos responsables de los sistemas de refrigeración, es preciso detenerse, pues son fundamentales en las instalaciones. En general, en la industria alimentaria el frío se utiliza en las dos terceras partes de las instalaciones, muy particularmente en el sector cárnico y pesquero. En esos casos, la refrigeración abarca todo el proceso de elaboración, desde su comienzo hasta la llegada al consumidor final. Es crucial que funcione adecuadamente pues cuanto antes se consiga reducir la temperatura a los niveles óptimos de almacenamiento, la conservación de alimentos frescos será más prolongada. Además, garantizar el mantenimiento de los niveles de frío durante todo el proceso de manufactura, almacenamiento y transporte resulta fundamental para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos producidos.

Cuando el ensuciamiento por acumulación de materia orgánica va acompañado de proliferación microbiana, se habla de *biofouling* (Characklis, 1990), que puede producirse sobre la superficie de equipos o en el interior de tuberías, sobre todo en los rincones, grietas, juntas y otros espacios a los que la limpieza y desinfección tiene mal acceso (nichos para la formación de BF) afectando significativamente tanto a su funcionamiento como a su vida útil (Salas y col., 2012). Simultáneamente, pueden ocurrir varios tipos de ensuciamiento, como el producido por la acumulación de productos de corrosión (óxidos metálicos), de materia orgánica (microorganismos, grasa, etc.) y depósitos calcáreos. Normalmente, la presencia de uno de ellos favorece la deposición de otros materiales.

En general, las superficies internas de circuitos cerrados, higienizables de forma frecuente y reproducible por procedimientos CIP (*Cleaning in Place*), son más seguras en este sentido. Sin embargo, también puede haber formación de BF en su interior. Estos depósitos formados en el interior de circuitos cerrados provocan la oclusión de orificios o de las mismas tuberías (Dreszer y col., 2013) lo que supone un estrechamiento de las mismas, modificando la fricción y la velocidad de flujo y causando así pérdidas de rendimiento en el proceso.

En ocasiones, también se forman BF en el interior de los intercambiadores de calor. Estos pueden ser de placas o de tubos y se usan por ejemplo en la operación de

precalentamiento de la leche antes del proceso UHT. Por el interior de los tubos, o entre placa y placa puede circular el fluido refrigerante o calefactor, o bien el propio alimento. Aparte de poder transferirse los microorganismos de los BF al alimento en contacto directo, los BF formados en la superficie intercambiadora de calor actúan como aislantes térmicos. Al haber más distancia de contacto entre los 2 fluidos disminuye la transferencia de calor entre los mismos. El producto puede sufrir calentamientos o enfriamientos deficientes y dar lugar a contaminaciones y/o fallos en el proceso. Además, algunos microorganismos presentes en BF catalizan reacciones que causan corrosión en los equipos. Todo esto supone en definitiva pérdidas económicas, por los fallos en el proceso, por el deterioro del equipo y por la pérdida de calidad del producto. Si los microorganismos alojados en el BF fueran patógenos, además supondría un riesgo importante para la salud pública.

Otros problemas técnicos frecuentes en la industria alimentaria son la oclusión de placas y membranas filtrantes. La filtración, en cualquiera de sus modalidades, es otra de las operaciones más comunes en el procesado de alimentos, especialmente en aquellos que no pueden sufrir tratamientos térmicos severos como algunas bebidas (industria cervecera, del vino y de los zumos). De manera similar a lo que sucedía en los circuitos cerrados, la formación de BF en los filtros provoca la oclusión de los mismos, dando lugar a paradas no programadas para la sustitución de piezas (*i.e.* fallos en el proceso) y por tanto a pérdidas económicas, sumadas a los costes de reposición de piezas.

Cuando los microorganismos que se encuentran formando BF en los filtros son patógenos, pudiendo transferirse a los alimentos por contacto directo y el alimento no va a sufrir un tratamiento posterior, se produce una situación especialmente preocupante para la salud pública. Uno de los casos más representativos de este tipo de contaminación es el producido por *Cronobacter sakazakii*. *C. sakazakii* es un patógeno oportunista emergente, que causa serias infecciones en niños por el consumo de las fórmulas infantiles en polvo contaminadas (Jaradat y col., 2014; Mullane y col., 2008). La contaminación puede ser extrínseca, producida durante la reconstitución de la fórmula en las instalaciones hospitalarias o bien intrínseca, ocurrida en la industria. Jacobs y col. (2011), llevaron a cabo un estudio muestreando en una planta de procesado de leche en polvo durante 3 años. El producto se obtenía mediante atomización y posteriormente se secaba y envasaba. Para recuperar el polvo residual del atomizador se usaban ciclones y filtros. El polvo recuperado a través de los filtros se reintroducía en el producto final, antes de envasar. Al muestrear, se dieron cuenta de que el producto contaminado era el que contenía polvo recuperado. Así, se dedujo que el reservorio era un BF de *C. sakazakii* alojado en el filtro del que se recuperaba el polvo residual.

2.3.2 Superficies abiertas

Aparte de los equipos presentes en las instalaciones, no se pueden obviar los pequeños utensilios (palas, cubetas, etc.), el equipamiento de los operarios (guantes, delantales, botas, etc.) y las superficies abiertas tanto verticales como horizontales (suelos, paredes, techos, puertas, desagües y cintas transportadoras) como sitios susceptibles de ensuciarse y por tanto susceptibles de alojar un BF.

Las superficies abiertas son bastante más problemáticas que los circuitos cerrados en lo que a la formación de BF se refiere. Generalmente están más dañadas porque se someten a limpiezas manuales y productos cáusticos. Esos daños superficiales los convierten en sitios donde se puede acumular la materia orgánica. Además, los protocolos para su limpieza y desinfección suelen ser de aplicación manual o semimanual, lo que los hace más vulnerables a fallos humanos. Las superficies cerradas suelen ser tratadas con CIP aplicados de forma automática, por lo que los resultados son más reproducibles. Las cintas transportadoras están presentes en la mayoría de las líneas de procesamiento para transportar alimentos a lo largo del proceso. Son de los componentes más difíciles de mantener libres de BF por su propio diseño. Son cintas sin fin y precisamente el diseño que las hace flexibles al movimiento, puede proporcionar nichos como los comentados anteriormente. Pueden además tener codos, engranajes complicados, una extensión excesiva, etc. Además, están expuestas a la deposición de partículas de BF vehiculadas por aerosoles, condensados o fragmentos sólidos de materiales que se desprenden del techo o de la maquinaria bajo la que transcurren. Se fabrican de materiales diversos: acero, teflón u otros plásticos. Los alimentos aún sin envasar, en su paso por las cintas transportadoras pueden sufrir golpes, romperse, dejar restos, etc. y toda esa suciedad que queda, alimenta a BF que están en contacto directo con alimentos.

A modo de ejemplo, uno de los brotes más importantes de la historia de *Lm* se produjo en EEUU en el año 2011 (McCollum y col., 2013). Afectó a 28 estados con más de 30 muertos, 1 aborto y casi 150 enfermos. Se relacionó con el consumo de melones de la variedad Cantaloupe. Dado que las mismas cepas fueron aisladas del producto y de la zona de embalaje de la planta (cintas transportadoras y drenajes de los suelos), se dedujo que la corteza de los melones se contaminaba a su paso por las cintas transportadoras hacia el embalaje y en el momento del corte pasaban de la corteza a la pulpa.

2.3.3 Materiales en la industria alimentaria

Los materiales ideales para su empleo en la industria alimentaria son aquellos que se ensucian poco y se limpian bien, además de ser inertes, es decir, los que no favorecen la incorporación al alimento de contaminantes químicos o microbianos. En cuanto a la formación de BF, los científicos están de acuerdo en asumir que es muy difícil que exista

un material que no permita en absoluto la adhesión de microorganismos (da Silva y col., 2012). Dentro de esta afirmación, sí que puede decirse que uno de los factores externos que condiciona la adhesión de microorganismos a superficies es el material. En la industria alimentaria pueden encontrarse aceros de distintos tipos, aluminio, zinc, plásticos muy variados, sobre todo teflón, pero también nitrilos (Storgards y col., 1999), goma, PVC (Chia y col., 2009), vidrio e incluso madera en los países en desarrollo (Mariani y col., 2011). Pero sin duda, el material por excelencia es el acero inoxidable, sobre todo de los tipos más estables a pH ácido.

Adetunji e Isola (2011), estudiaron la formación de BF sobre madera, vidrio y acero inoxidable. Los resultados mostraron que la madera favorecía la formación de BF por su porosidad. El vidrio, por su lisa superficie y su resistencia frente a la corrosión, fue indicado como material de preferencia. El acero inoxidable ofrece mejor resistencia frente a impactos que el vidrio, pero es más vulnerable a la corrosión. Los aceros austeníticos con cromo y níquel, como el AISI 304 o el AISI 316 son muy usados en la industria alimentaria. A pesar de que estos aceros presentan una elevada resistencia a la corrosión por los alimentos (pH ácido, concentración salina), a la limpieza (detergentes) e incluso a la corrosión (el AISI 316, incorpora molibdeno para aumentar sus propiedades anticorrosivas, razón por la que es muy usado en la industria láctea), no hay ningún material inmune al deterioro. Las ralladuras y la corrosión facilitan la adhesión de los microorganismos, pero también el acabado (troquelado, pulido, revestimiento) tiene un efecto. Whitehead y Verran (2009) han mostrado cómo las células de *Lm*, se incorporan preferentemente a las mínimas acanaladuras producidas por el troquelado del acero (Fig. 5). La adecuada gestión del mantenimiento de los equipos empieza por la vigilancia y sustitución frecuente de piezas que sufren mucho desgaste y cuyas irregularidades de relieve pueden proporcionar refugio para los microorganismos. Esta actividad supone una estrategia crucial para prevenir y controlar la formación de BF en la industria alimentaria.

Otras de las piezas más problemáticas son las cuchillas de las máquinas de corte, especialmente, aquellas localizadas en salas blancas, donde por ejemplo, se lonchean productos listos para el consumo (*Ready To Eat*, *RTE*) o, en las cortadoras de vegetales frescos que son productos mínimamente procesados. Es fundamental que estas piezas estén en perfecto estado, por eso suelen ser pulidas y afiladas regularmente. El efecto del afilado es crítico para minimizar la adhesión y para evitar la transferencia de microorganismos por contacto. La elección del método de pulido también es importante. Schlisselberg y Yaron (2013), utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) evaluaron el efecto del método de afilado o pulido de cuchillas de acero sobre la adhesión de *S. Typhimurium*. Se observó que empleando pulido con alúmina y electropulido se reducía significativamente la adhesión de este microorganismo con respecto al pulido con arena o a la muestra sin pulir.

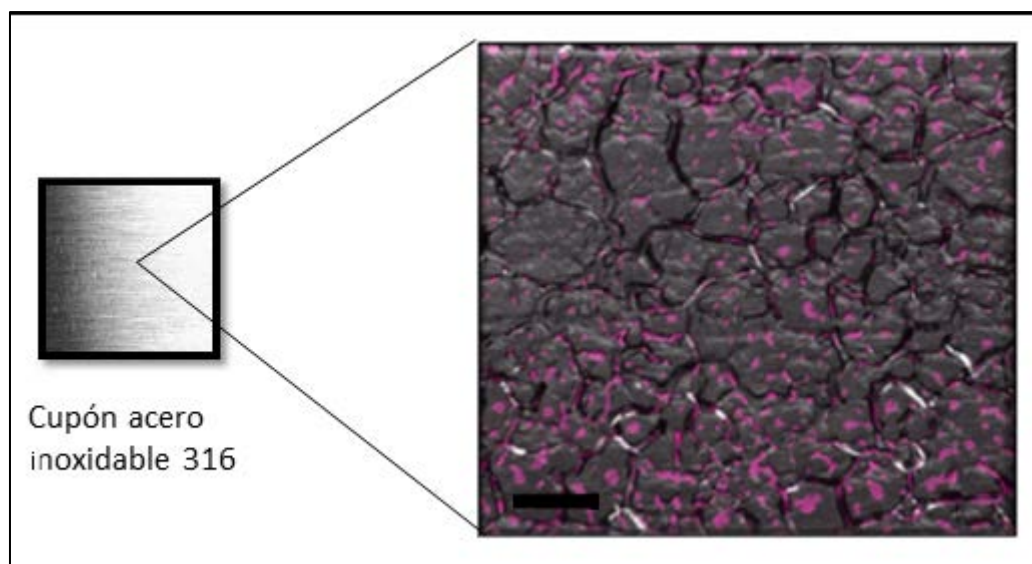


Figura 5. Imagen obtenida por CLSM de un biofilm de *Listeria monocytogenes* (en rosa), sobre un cupón de acero inoxidable 316. Las células se colocan en los surcos propios de la microestructura del material (barra = 20µm).

Pero el material no es lo único que condiciona la adhesión, también el tipo de producto que se procesa interviene en este fenómeno, aunque a menudo no se tenga muy en cuenta. Wang y col. (2015), compararon la velocidad de transferencia por corte de las células adheridas de *Salmonella* a distintos productos cárnicos (jamón cocido, salchichón, beicon y pollo asado) usando como sistema para el desarrollo de los BF cuchillas de acero inoxidable. Los resultados mostraron que cuanto más hidrofóbica era la superficie del alimento mayor era la velocidad de transferencia de las salmonellas. Los productos secos y con irregularidades superficiales como el pollo asado, presentaron una menor superficie de contacto y por tanto menor tasa de transferencia con respecto a los de mayor contenido en grasa y superficies lisas como el jamón cocido.

Otro ejemplo sobre la importancia de la materia prima que se procesa, es el de López-Gálvez y col. (2010). Estos autores vieron con SEM que las células adheridas de *E. coli* no eran eliminadas tras el tratamiento con hipoclorito pues se hallaban refugiadas en los surcos de los tejidos vegetales formando microcolonias. Esta localización les atribuía protección extra en comparación con las mismas células suspendidas en medio acuoso.

2.4 MICROBIOTA PRESENTE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los microorganismos presentes en el ambiente de una planta de procesado de alimentos pueden clasificarse en 2 grandes grupos. Por un lado, está la microbiota residente o microbiota indígena (Jahid y Ha, 2014), es decir aquella propia de cada instalación, asociada a la materia prima con la que se trabaja y a los operarios. Por otro lado, existe otra microbiota no residente, cuya presencia en las instalaciones es

accidental u ocasional. Dentro de este grupo pueden darse 2 posibilidades. La contaminación puede ser esporádica o no esporádica. En el primer caso, se refiere a una contaminación transitoria que ocurre de forma ocasional y no vuelve a repetirse. En el segundo caso, se habla de microbiota persistente, o lo que es lo mismo, recurrente, pues esos microorganismos son capaces de mantenerse en la planta durante largos periodos de tiempo. Esta microbiota persistente es actualmente la que más preocupa. Se trata de ciertas cepas capaces de permanecer en las plantas durante meses e incluso años, sin ser eliminadas por los sistemas de limpieza y desinfección.

2.4.1 Patógenos implicados

En el contexto alimentario la formación de BF es, como ya se ha indicado, un problema de seguridad alimentaria, puesto que pueden alojar especies o cepas patógenas (Brooks y Flint, 2008; Shi y Zhu, 2009; Srey y col., 2013). Duguid y col. (1966) fueron los primeros en describir la adhesión de una bacteria de transmisión alimentaria, en concreto *Salmonella*, a una superficie en contacto con alimentos. Desde entonces y hasta la fecha, muchos trabajos han tratado esta capacidad de los microorganismos patógenos para formar BF en las instalaciones de la industria alimentaria, tanto *Lm* (Frank y Koffi, 1990; Herald y Zottola, 1988; Mafu y col., 1990), como *Yersinia enterocolitica* (Herald y Zottola, 1988), *C. jejuni* (Kuusela y col., 1989) y *E. coli* O157:H7 (Dewanti y Wong, 1995) entre otros. Más adelante, microorganismos como *Bacillus cereus*, *Shigella* spp., *S. aureus* (Sharma y Anand, 2002), *Vibrio* spp. (Bagge-Ravn, 2003) o *C. sakazakii* (Iversen y col., 2004; Leclercq y col., 2002) han sido identificadas como habitantes de BF. Normalmente no están compuestos por una única bacteria sino más bien por varias, interaccionando tanto biológica como espacialmente en función de las especificidades de cada una de las subpoblaciones presentes.

2.4.2 El caso de *Listeria monocytogenes*

Lm sigue siendo uno de los microorganismos que más preocupa en el mundo por ser responsable de la listeriosis, enfermedad de transmisión alimentaria potencialmente letal para el hombre y los animales. Si bien es cierto que la listeriosis tiene una incidencia realmente baja en comparación con otras como la campilobacteriosis, salmonelosis o la yersiniosis, su alta tasa de mortalidad (20-30%), la mayor de la UE, la sitúa en el punto de mira de las autoridades sanitarias. En concreto, según datos aparecidos en el último informe publicado por la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA, 2015), en el año 2013 se le atribuyeron 13 brotes por consumo de alimentos RTE, responsables de 191 muertes en la UE. Por otro lado, en EEUU durante 2013, se registraron 123 casos, 112 hospitalizaciones y 27 muertes provocadas por *Lm* (Centro para la Prevención y Control de Enfermedades, CDC, 2013).

Lm es una bacteria Gram positiva capaz de atravesar varios tipos de barreras en el organismo hospedador (la materno-fetal, la intestinal, y la sanguíneo-cerebral) y

sobrevivir cuando son fagocitadas por macrófagos e invadir y sobrevivir en células no fagocíticas. Las personas más susceptibles a esta bacteria son las mujeres embarazadas, los inmunodeprimidos y los ancianos, y su infección puede provocar meningitis, aborto y septicemia (Vázquez-Boland y col., 2001).

Se trata de una bacteria muy ubicua que puede entrar en las plantas de procesado a través de diversas rutas (Moretro y Langsrud, 2004). Se ha descrito su presencia en industrias cárnicas, lácteas, pesqueras y de vegetales (Valk y col., 2005; Mena, 2004). Una vez en las instalaciones, puede establecerse en determinados nichos (*i.e.* zonas de difícil acceso a los sistemas de limpieza y desinfección) y persistir allí durante largos periodos de tiempo (Keto-Timonen y col., 2007; Lundén y col., 2000; Ortiz y col., 2010) en forma de BF (Valderrama y Cutter, 2013). Su capacidad para adherirse a varios materiales presentes en la industria alimentaria como el acero inoxidable, el vidrio, el polipropileno ha sido frecuentemente descrita (Di Bonaventura y col., 2008).

Muchos autores apuntan a que en ambientes reales, es decir, en las plantas de procesado de alimentos, es más que probable que *Lm* no se encuentre sola, sino formando parte de BF multiespecie con otras bacterias más o menos compatibles presentes en la planta (Elias y Banin, 2012; Hassan y col., 2004; Jahid y Ha, 2014). Este hecho, que se discutirá más adelante, es esencial para su persistencia. Como ya se ha señalado en otros apartados, la presencia de microbiota acompañante puede suponer cambios en la matriz, en la distribución dentro del BF y en la estructura del mismo, pudiendo tener estos cambios un efecto protector frente a situaciones de estrés como los tratamientos de limpieza y desinfección u otras estrategias de control empleadas en la industria alimentaria (Burmolle y col., 2014; Giaouris y col., 2013; Simões y Vieira, 2009).

Estando presentes en las instalaciones donde se procesan alimentos (probablemente en forma de BF), las células de *Lm* se pueden transferir a los mismos (Dauphin y col., 2001; Latorre y col., 2010; Wesche y col., 2009). Este microorganismo es por otra parte capaz de sobrevivir y crecer a bajas temperaturas (Carpentier y Cerf, 2011; Chaturongakul y col., 2008) y en ambientes con baja actividad de agua, lo que le permite seguir proliferando en refrigeración y sobrevivir al secado de salpicaduras. Esto es especialmente preocupante en el caso de los productos RTE, que no sufren procesado posterior y tienen un periodo de vida útil en refrigeración relativamente extenso. De estar contaminados con este patógeno, los niveles inicialmente bajos de *Lm* pueden aumentar durante el almacenamiento y alcanzar niveles suficientemente elevados en el momento del consumo para producir una toxiinfección. Es por todo esto que la capacidad para formar BF se ha considerado uno de los mayores factores de virulencia de esta bacteria. Conocer los mecanismos implicados en dicha capacidad es importante pues para la seguridad alimentaria.

Los 13 brotes de *Lm* antes citados y documentados en 2013 en Europa, estuvieron asociados precisamente a productos RTE, en concreto, pescado ahumado, queso fresco y productos cárnicos. De hecho, entre 2011 y 2013, el mayor nivel de incumplimiento de la norma microbiológica europea (Reglamento (CE) N° 1831/2003) al final del procesado se dio en los productos RTE elaborados en plantas de procesado de pescado, principalmente, de pescado ahumado en frío (EFSA, 2015). Dicha norma establece que los niveles de *Lm* en productos RTE deben ser menores o iguales a 100 UFC·g⁻¹. En el caso de que sean alimentos que permiten el crecimiento de la bacteria, deberán cumplir el criterio de ausencia en 25g antes de abandonar la planta del procesado, y no exceder de 100 UFC·g⁻¹ en el momento del consumo. Por último, si se trata de alimentos infantiles o alimentos destinados a población de riesgo, vuelve a aplicarse la norma de ausencia en 25g.

En concreto, en el caso del salmón ahumado, a grandes rasgos, el ahumado, la salmuera y el posterior envasado a vacío al que se somete el producto, favorecen la prolongación de su vida útil durante la conservación en refrigeración. Sin embargo, permite el crecimiento de *Lm* y se consume sin tratamiento previo (Kin y col., 2012; Uyttendaele y col., 2009). Todo esto, unido a la presencia habitual y en algunos casos persistente de *Lm* en las plantas de procesado, convierte al salmón ahumado en un producto de alto riesgo. *Lm* además de psicrótrofa, es anaerobia facultativa. Numerosos estudios confirman que si esta bacteria entra en una planta de manipulación de salmón, tiene altas probabilidades de hacerse persistente, al haber en este tipo de instalaciones equipos y zonas de trabajo especialmente conflictivas y difíciles de limpiar (Aarnisalo y col., 2007). La mayoría de los estudios coinciden en que las máquinas loncheadoras y las tablas de corte son posibles reservorios de cepas persistentes. Así, Dass y col. (2010), encontraron células de *Lm* presentes sistemáticamente durante un año, en tablas de fileteado, cintas de transporte, cuchillas y máquinas de quitar espinas, tras la aplicación de los sistemas de limpieza y desinfección habituales en una industria elaboradora de salmón ahumado.

2.4.3 Interacciones ecológicas. Amigos y enemigos

En la naturaleza el modo de vida microbiano predominante son los BF y predominantemente aquellos integrados por más de una especie (Hall-Stoodley y col., 2004) tanto en los ambientes plenamente naturales como en los contruidos por el hombre. Desde un punto de vista ecológico, los BF multiespecie permiten que especies en un principio incompatibles se organicen espacialmente en estratos y cooperen entre ellas para la degradación final de compuestos tóxicos (Sanchez-Vizuet y col., 2015).

Sin embargo, en el ámbito de la medicina esto supone un agravamiento de la situación para el huésped, porque las infecciones asociadas a BF multiespecie (multipatogénicos) son mucho más serias y difíciles de controlar (Wolcott y col., 2013) y

no solo por el aumento de la resistencia a antibióticos observado en estos BF (Adam y col., 2002; Al-Bakri y col., 2005; Harriott y Noverr, 2009; Lee y col., 2014; Luppens y col., 2008).

De manera similar, en los entornos propios de la industria alimentaria la microbiota residente, muy probablemente adaptada a los desinfectantes usados en la planta, puede formar BF multiespecie con elementos de la microbiota no residente patógena, favoreciendo su supervivencia y persistencia en las plantas de procesado (Burmolle y col., 2014; Jahid y Ha, 2014; Sanchez-Vizueté y col., 2015). Pese a la importancia de este aspecto, las investigaciones sobre los BF mixtos en la industria alimentaria, están aún en una etapa incipiente. Por ello, y dada la enorme heterogeneidad de los posibles nichos dentro de las diferentes industrias alimentarias, la variabilidad entre cepas y la deficiente estandarización de los procesos metodológicos, pueden encontrarse estudios con resultados contradictorios.

2.4.3.1 La formación de biofilms multiespecie en entornos alimentarios

Como ya se ha indicado, la formación de BF multiespecie en el ambiente de una industria alimentaria está condicionada por multitud de factores como la variación en cuanto a materia prima entrante, el clima, la ubicación de la planta, la composición en cuanto a especies de la microbiota residente y no residente, el tipo de industria, la temperatura y otras condiciones de cultivo, los sistemas de QS y, una vez iniciado un BF, la producción de matriz, la maduración y la dispersión del mismo.

Una de las consecuencias negativas de la formación de estos BF en la industria alimentaria, es que la presencia de una bacteria puede favorecer la tasa de adhesión de otra, es decir, que puede haber cooperación entre las especies integrantes del BF. Si uno de los integrantes es una especie patógena, es muy probable que esto dificulte su control. Por ejemplo, muchos estudios demuestran que la microbiota residente en las industrias lácteas favorece la formación de BF de bacterias patógenas, siendo *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus sciuri* y *Stenotrophomonas maltophilia* las especies predominantes en este sentido (Cleto y col., 2012; Rieu y col., 2008). Resultados similares se han obtenido en otros sectores de la industria alimentaria. No obstante, no todas las interacciones posibles son positivas. Hay estudios que encuentran resultados muy variados, a veces dependientes de cepa (Carpentier y Chassaing, 2004). De hecho, el antagonismo debido a bacterias ácido lácticas puede servir para excluir de superficies a bacterias no deseadas (Yang y col., 2011). En definitiva en un entorno determinado y en unas condiciones concretas, un patógeno puede encontrarse con "amigos" o "enemigos" (Jahid y Ha, 2014). Cuando la interacción es negativa, es decir, son "enemigos", se produce competencia o competición, cuyo balance final depende del entorno y la proporción relativa de las poblaciones enfrentadas. La presión por el acceso a los nutrientes puede hacer que una de las especies produzca compuestos tóxicos que

perjudiquen a su acompañante (Yang y col., 2011). Cuando la interacción es positiva para ambas especies, es decir, son “amigos”, se establece una cooperación, que se puede reflejar en el tamaño de las poblaciones resultantes o en una capacidad mejorada para enfrentarse a uno u otros tipos de estrés.

Tanto la estructura como el comportamiento de los BF mixtos son obligadamente diferentes y más complejos que los de sus homólogos BF puros, además de hacer aparecer nuevos fenotipos y formas de relación, como fruto de la interacción entre las diferentes especies (Yang y col., 2011; Sanchez-Vizuite y col., 2015). Si se consideran las distintas etapas de formación del BF, se irán encontrando precisamente estos aspectos de mayor complejidad y novedad.

Algunos autores, sobre todo los centrados en el estudio de microbiota oral, defienden que la coagregación celular está implicada en la formación de BF multiespecie (Rickard, y col., 2003), siendo determinadas proteínas de membrana, en concreto las adhesinas, las principales responsables de este fenómeno (Yang y col., 2011). También los pili y los flagelos parecen ser esenciales para la formación de estos BF. Por ejemplo, *P. aeruginosa*, necesita del pili tipo IV para “escarbar” e introducirse en el inmaduro BF de *A. tumefaciens* (An y col., 2006).

El QS, no funciona en los BF mixtos igual que en los cultivos puros, pues son procesos dependientes de la densidad celular de cada integrante y además porque pueden existir interferencias entre los sistemas de comunicación de las diversas especies. Debido a estas interferencias, algunos mecanismos participantes en la adhesión como los apéndices, la movilidad o la producción de EPS, pueden verse afectados (Jahid y col., 2013).

Se ha postulado que en los BF mixtos la adhesión ocurre de manera que la especie que primero llega a la superficie y contacta con ella, es la que tiende a dominar la situación, iniciando la cooperación o el antagonismo con la otra especie, pudiéndose desarrollar distintos modos de interacción según el socio que en cada ocasión consiga tomar la iniciativa o en función de parámetros ambientales (Monds y O’Toole, 2009).

Una vez conseguida la adhesión comienza a formarse la microcolonia. En BF mixtos esta fase ha sido poco estudiada, pero parece depender mucho de las especies implicadas. En cuanto a la estructura, parece que el eDNA tiene un importante papel reforzando la arquitectura (Dominiak y col., 2011), viéndose aumentado su contenido en la matriz. También se ha descrito una mayor producción de EPS en los BF mixtos que en los puros (Bridier y col., 2012; Cowan y col., 2000; Alavi y Hansen, 2013; Jahid y Ha, 2014; Wang, Kalchayanand y col., 2013), dando lugar a estructuras 3D fuertemente compactadas (Burmolle y col., 2006; Kuznetsova y col., 2013). Además de que la producción de EPS parece aumentada, es importante tener en cuenta que los

compuestos producidos por una de las especies pueden servir para mantener aglutinadas en la estructura a otras bacterias que no tengan esa capacidad o al menos no la tengan en tal medida. Es decir, que la aportación de cada subpoblación a la matriz global del BF no tiene por qué corresponderse con la proporcionalidad de dichas poblaciones en el BF. De hecho, hay bacterias que por sí mismas, en cultivos puros, forman BF bien distintos en su matriz y por tanto en su estructura, fisiología y comportamiento que los formados en presencia de otras especies (Flemming y Wingender, 2010).

Por último, en la fase de dispersión también se encuentran diferencias ya que las interacciones entre las especie modifican la dispersión como respuesta a fenómenos ambientales (Jahid y Ha, 2014).

2.4.3.2 Biofilms portadores de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria

En este sentido, es preocupante el hecho de que *Lm* puede sacar beneficio al establecerse en BF multiespecie con la flora residente de una industria alimentaria. En concreto, bacterias con muy buena capacidad de formación de BF como es el caso de *Pseudomonas* spp, muy abundantes en la industria láctea (Cleto y col., 2012) y en la cárnica (Habimana y col., 2010), pueden contribuir a la persistencia de *Lm* en las instalaciones de la industria alimentaria (Giaouris y col., 2015).

En la literatura científica se encuentran varios estudios sobre las interacciones entre *Lm* y otras bacterias. Hassan y col. (2004) por ejemplo, encontraron más de 3 log UFC·cm⁻² de aumento en la adhesión de *Lm* sobre un BF preformado de *Pseudomonas putida* que sobre una superficie libre de *P. putida*. Más recientemente, se ha descrito una interacción también positiva entre *Lm* EGD-e y *S. aureus* CIP 53.156, tanto en condiciones estáticas como dinámicas, a 25°C sobre acero inoxidable (Rieu y col., 2008). En otro estudio, se evaluó el efecto que sobre la adhesión de *Lm*, tenían 29 cepas residentes en una instalación alimentaria (aisladas tras la limpieza y desinfección). De esas 29, 4 actuaron como “amigas” o cooperadoras con *Lm*, también a 25°C y sobre acero inoxidable (Carpentier y Chassaing, 2004). Pero hay más estudios con resultados en la misma línea (Saá Ibusquiza y col., 2012; van der Veen y Abee, 2011). En el trabajo de Carpentier y Chassaing (2004), de las 29 cepas, 9 eran de *Pseudomonas*, 7 de las cuales actuaron como “enemigas” de *Lm* y el resto no tuvieron ningún efecto sobre *Lm*, mostrando pues que la interacción era cepa-dependiente. Otros estudios no encontraron diferencias al evaluar la compañía de *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., y *Pf* sobre *Lm* (Alavi y Hansen, 2013; Gudmundsdóttir y col., 2005).

Sin embargo, también se han encontrado casos en los que la presencia de acompañantes ha reducido la capacidad de *Lm* para formar BF. Por ejemplo, en el estudio de Leriche y Carpentier (2000), tras 3 días de incubación a 25°C sobre acero

inoxidable en presencia de *S. sciuri*, la formación de BF de *Lm* fue menor. Hay más estudios que obtienen resultados similares (Giaouris y col., 2013). Mientras Zhao y col. (2006, 2013), defienden que el antagonismo es debido a la producción de metabolitos antilisteria, otros estudios sugieren que el mecanismo principalmente implicado es la competencia por los mismos nutrientes (Guillier y col., 2008).

Queda por aclarar el papel concreto de las señales de QS y el *quorum quenching* (la cancelación de las señales de QS mediante enzimas degradadoras o la producción de compuestos competidores) y de la distribución espacial, en las interacciones positivas, negativas o neutras con *Lm* (Bassler y Losick, 2006; Chen y col., 2013).

2.4.3.3 Protección de patógenos en biofilms multiespecie

Parece cada vez más probable que el modo de vida en una comunidad mixta ya equilibrada proporcione a sus miembros un estado superior de protección frente a situaciones de estrés ambiental, incluyendo la acción de los desinfectantes. Numerosos estudios han observado mayor resistencia a desinfectantes en los BF mixtos con respecto a los cultivos monoespecie (revisado en Sanchez-Vizueté y col., 2015). Sin embargo, este comportamiento no es, como se mencionaba más arriba, universal sino que depende de las interacciones posibles entre cada especie, así como de factores ambientales externos como la temperatura o el tipo de biocida. Un ejemplo sería la asociación de *B. cereus* y *Pf*, ambas aisladas frecuentemente de la industria alimentaria. Su interacción parece hacerles mucho más resistentes a 2 desinfectantes, el dióxido de cloro y el glutaraldehído (Lindsay y col., 2002; Simões y col., 2009).

Aunque los motivos de este fenómeno están aún pendientes de aclarar (Jahid y Ha, 2014), la protección que confiere el modo de vida adherido en BF monoespecie (apartado 2.5.1 *Limpieza y desinfección rutinaria*), unido a nuevos aspectos fruto de la propia naturaleza de las interacciones (intra- e interespecie) juegan aquí también un papel relevante.

Las modificaciones en la matriz que suelen darse en este tipo de BF pueden optimizar la supervivencia de las células albergadas en ellos. Por un lado, porque la cantidad de EPS producida sea mayor o porque su estructura interna sea más compleja, limitando en mayor medida la velocidad de difusión-reacción de los biocidas. Por otro lado, algunos autores han observado que determinadas especies producen ciertos compuestos que resultan beneficiosos para toda la comunidad. Por ejemplo, la secreción de enzimas como una hidrolasa de *P. aeruginosa* (Lee y col., 2014) o proteínas de tipo amiloide, como las *curli*, en *B. subtilis* o *Salmonella* spp. (Zhou y col., 2012). Otra posibilidad es que la presencia de otras especies estimule la aparición de una población mutante con una capacidad aumentada para producir compuestos que interfieran con los biocidas, como es el caso de *P. putida* en presencia de *Acinetobacter* spp. descrito por Hansen y col. (2007).

Las diferentes especies pueden organizarse en capas, o bien en microcolonias, ya sea segregadas o mezcladas (Elias y Banin, 2012). La distribución espacial de las especies en el BF, fruto también de sus interacciones específicas, condiciona en parte su supervivencia frente a agentes antimicrobianos (Simões y col., 2009). Incluso puede dar lugar a la existencia de zonas en los BF con distintos niveles de estrés celular (Serra y Hengge, 2014). Esto va depender de las condiciones ambientales locales, en concreto, de los gradientes de oxígeno, distintos nutrientes y metabolitos (Stewart y Franklin, 2008). Algunos autores han observado que la reducción de la tasa de oxígeno protege a una determinada población dentro de un BF mixto (Leriche y col., 2003). Como ya se ha dicho, es fácil pensar que las células alojadas en capas profundas, “enterradas”, están en un estado metabólicamente menos activo, lo que les hace menos vulnerables a muchos antimicrobianos. Por otro lado, las condiciones ambientales imperantes en una localización concreta, también pueden inducir ahí la aparición de células “persistoras” (*persistor cells* o *persistors*), que como ya se explicará más adelante son muy resistentes a los tratamientos. No puede olvidarse que la posición más profunda, puede ser un factor de protección “geográfico”. Al estar físicamente cubiertas de más biomasa, las células están menos expuestas a cualquier agente externo.

Volviendo al papel del QS en los BF mixtos, el sistema de comunicación AI-2, es considerado como el lenguaje universal de las bacterias (Pereira y col, 2013; West y col., 2012), pues como ya se ha explicado está presente tanto en Gram positivas como en Gram negativas. Pero hay además otras muchas señales, de forma que en comunidades multiespecie, pueden interferir unas con otras estimulando, inhibiendo o inactivando sus señales (Bauer y Robinson, 2002; Elias y Banin, 2012; Rendueles y Ghigo, 2012; Zhang y Dong, 2004). Estas interferencias pueden suponer un artefacto en los procesos de comunicación que afecte a la capacidad de las bacterias para adaptarse al medio.

Por último, la transferencia horizontal de material genético que favorece la adquisición de un nivel de protección más elevado, parece estar aún más favorecida en los BF multiespecie, quizá porque haya más cantidad de eDNA (Pammi y col., 2013), por las mayores tasas de densidad celular, o porque la interacción entre especies potencie estos fenómenos de transferencia. Además de estos, se ha descrito un sistema directo de intercambio de materiales citoplasmáticos (DNA, proteínas, etc.) entre *B. subtilis* y *E. coli* a través de unos apéndices llamados nanotubos (Dubey y Ben-Yehuda, 2011).

2.5 SITUACIONES DE ESTRÉS. LA PARADOJA

Para tratar de controlar todas estas amenazas a las que la industria alimentaria se enfrenta, se llevan a cabo una serie de medidas preventivas y de control. La tecnología de barreras, supone el empleo de varias medidas simultáneas o secuenciales para abordar el riesgo, a través de varios métodos que inciden sobre diferentes puntos del problema. Paradójicamente, estas estrategias acaban exponiendo a las bacterias a

condiciones insuficientemente severas para ocasionar su muerte, pero que provocan la aparición de bacterias dañadas subletalmente. Estas bacterias adquieren respuestas adaptativas que les permiten sobrevivir, y a menudo ganar resistencia, frente a esa y a veces otras situaciones de estrés, por medio de las llamadas protecciones cruzadas (Wesche y col., 2009). Dado que estas respuestas adaptativas responden a modificaciones en el comportamiento que pueden transferirse a otras bacterias, lo que en principio era una herramienta de control, puede convertirse en un nuevo problema.

2.5.1 Adaptación a la limpieza y desinfección rutinarias

Los desinfectantes son compuestos químicos usados con el objetivo de inactivar microorganismos, en concreto, patógenos. A diferencia de los antibióticos, que interaccionan específicamente con estructuras o procesos metabólicos de las células, los desinfectantes actúan de manera mucho menos específica, frente a multitud de dianas (Meyer y Cookson, 2010). Así, el método de acción de los desinfectantes, que depende del tipo de compuesto usado, puede ser desde provocar daños en las superficies externas de las células o en la membrana citoplasmática, hasta interaccionar con proteínas estructurales o funcionales, DNA, RNA u otros componentes del citoplasma (Russell, 2003).

La supervivencia de microorganismos a estos tratamientos tanto en ambientes hospitalarios, como en la industria alimentaria o en entornos domésticos ha sido ampliamente descrita (Bagge-Ravn, 2003; Stocki y col., 2007; Weese y Rousseau, 2006). Esta supervivencia se asocia con frecuencia a la presencia de BF, en su mayoría multiespecie (Burmolle y col., 2014; Giaouris y col., 2013; Simões y col., 2010). En los últimos tiempos, se ha postulado que la capacidad para sobrevivir a los biocidas de una población de bacterias en un BF es un fenómeno multifactorial que tiene que ver directa e indirectamente con la estructura tridimensional y con la matriz, y conlleva varios mecanismos: difusión limitada de los compuestos a través de la misma, capacidad adquirida de las células para degradar el compuesto en cuestión, expresión de otros mecanismos genéticos específicos de BF y presencia de células persistoras entre otros (Lebeaux y col., 2014) (Fig. 6).

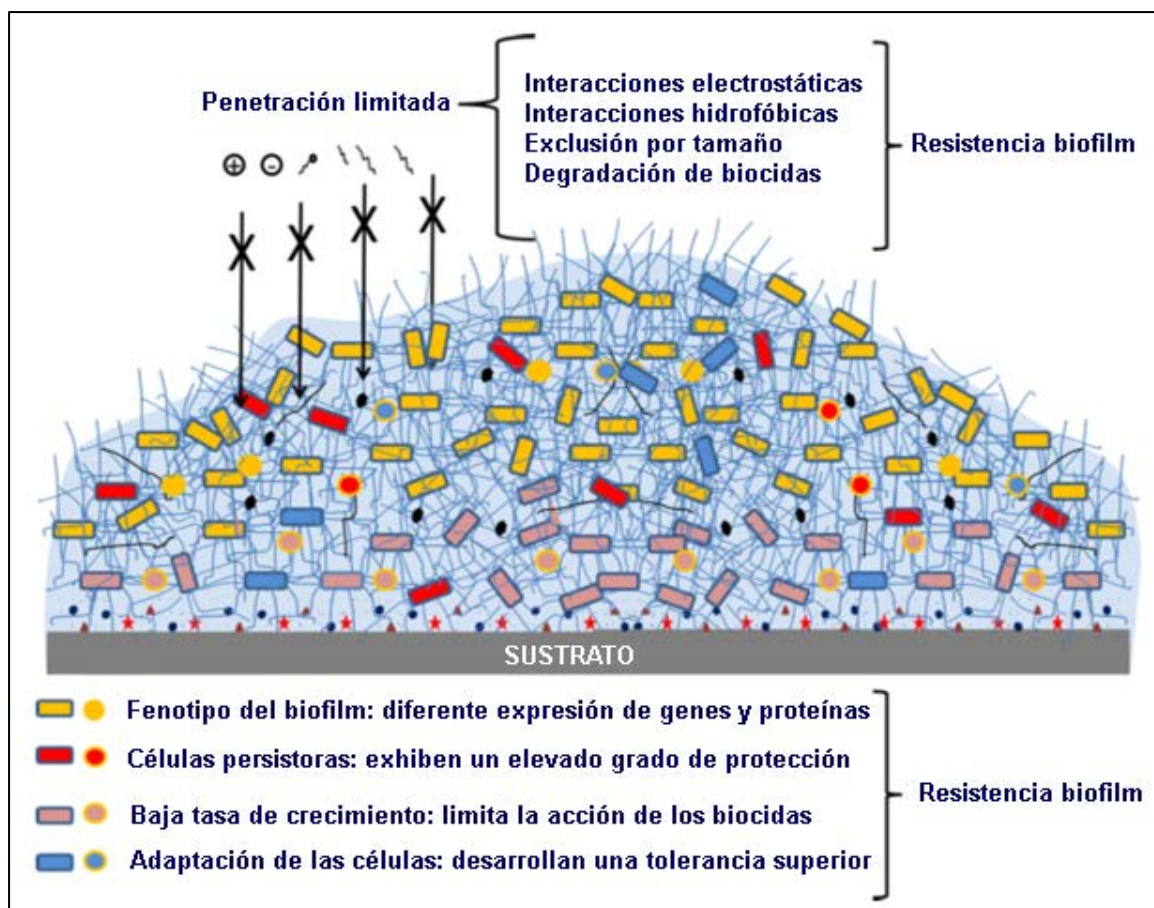


Figura 6. Mecanismos implicados en la resistencia frente a antimicrobianos en los biofilms. Adaptado de Abdallah y col. (2014).

Antes de profundizar en estos aspectos conviene aclarar la terminología. Cuando una bacteria sobrevive a un tratamiento que atenta contra ella se dice que es resistente o tolerante. Pero cada término se refiere a una situación diferente. La resistencia hace referencia a una población que no es destruida al exponerse a un biocida (concentración y tiempo determinados) que sí mata a la mayoría de sus homólogas, siendo la causa una modificación permanente, como una mutación genética. Sin embargo, cuando la causa no es una modificación genética, es decir, permanente, sino reversible, como por ejemplo una adaptación fenotípica, se habla de tolerancia (Langsrud y col., 2003; Mah, 2012a).

En este sentido, la protección que ejercen los BF es difícil de establecer globalmente como resistencia o tolerancia. Podría decirse que se aproxima más a una tolerancia que a una resistencia, pues en muchos casos, es fruto de un estado fenotípico propio de la vida en BF. Así, cuando las células adheridas abandonan el BF, frecuentemente, pierden este estado fisiológico y con él su protección frente a biocidas (Bridier y col., 2011). Sin embargo, normalmente se habla de resistencia a biocidas de los BF más que de tolerancia pues en el fondo, es un estado fundamentalmente estable y

permanente mientras se mantiene el modo de vida adherido. Además, con frecuencia se compara la respuesta frente a biocidas en población planctónica y adherida.

A diferencia de lo que existe para células planctónicas, no hay un método estandarizado para evaluar la resistencia de los BF frente a un biocida (Buckingham-Meyer y col., 2007). Lo que se hace es adaptar los protocolos existentes para células en suspensión pero sin estandarizarlos, lo que dificulta enormemente la comparación de resultados. Puede ser en parte por esto por lo que a pesar de la multitud de trabajos que han demostrado la mayor resistencia de los BF a los desinfectantes, aún no se haya diseñado un procedimiento capaz de gestionar el problema eficazmente.

La resistencia en BF no se explica por un mecanismo único sino más bien, como un hecho multifactorial en el que varios fenómenos operan en conjunto, en mayor o menor medida, consiguiendo un estado global de protección (Olsen, 2015). El denominador común de todos los mecanismos implicados parece ser la respuesta a situaciones de estrés, aunque otros autores mantienen que es la estructura lo que relaciona a todos ellos (Bridier y col., 2015). Además, también hay que tener en cuenta la heterogeneidad celular típica de los BF (Mah, 2012b; Roberts y Mullany, 2010).

Por un lado, la estructura tridimensional de los BF, integrada por una matriz que aglutina las células entre sí y a la superficie formando una microcolonia, supone una importante barrera física para la entrada de compuestos al interior del BF. La materia orgánica que compone la matriz (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos) interacciona fisicoquímicamente con los biocidas, retardando su paso hacia el interior del BF. Davison y col. (2010), determinaron mediante CLSM que la penetración de compuestos de amonio cuaternario (CUAT) hasta el centro de una microcolonia de *S. epidermidis* era sesenta veces más lenta. Sin embargo, algunos autores han descrito la ineficacia de desinfectantes a pesar de no demostrar ningún problema de penetración (Stewart y Costerton, 2001).

En segundo lugar, la adaptación de las células del BF a concentraciones subletales de desinfectantes es de particular relevancia en la industria alimentaria. Debido a la limitación de la difusión y la reacción de los desinfectantes provocada por la matriz, hay zonas del BF donde las células solo quedan expuestas a concentraciones subletales del biocida. De esta manera, llegan a desarrollar una respuesta adaptativa específica. Mangalappalli-Illathu y Korber (2006), describieron por primera vez la adaptación de las células de un BF, en concreto de *Salmonella*, frente a un desinfectante. La respuesta consistió en la sobreexpresión de proteínas implicadas en el metabolismo energético, en la biosíntesis, en la adaptación y en la detoxificación, además de un cambio en la composición de los ácidos grasos de la membrana. Los autores constataron que, en definitiva, esta respuesta confería a la población adherida, mayor capacidad para sobrevivir. En la industria alimentaria este aspecto está potenciado, ya que los

protocolos de limpieza y desinfección ajustados a la industria en cuestión, se repiten periódicamente. Esto supone, en los BF, una exposición reiterada a estas concentraciones subletales, provocando el asentamiento de subpoblaciones fuertemente resistentes colonizando las instalaciones.

Un tercer mecanismo depende de las adaptaciones fenotípicas de las células del BF. Por ejemplo, el hecho de que en el BF se creen microgradientes (como se ha explicado en el apartado 1.4.1 *Consecuencias de la estructura*) determina que haya células en diferentes estados metabólicos. La disminución de la tasa de crecimiento y de actividad en capas profundas, conlleva modificaciones a nivel de la membrana, de la expresión de genes implicados en mecanismos de defensa, y de los propios procesos que son objetivo de los agentes antimicrobianos, pudiendo incrementar la resistencia de dichas células (Lisle y col., 1998; Sabev y col., 2006; Saby y col., 1999; Stewart y Olson, 1992; Taylor y col., 2015). Algunas respuestas generales frente a estrés químico han sido descritas como características de BF. Por ejemplo, se ha demostrado la inducción de varios genes implicados en el estrés oxidativo en BF de *Lm*, *P. aeruginosa*, *E. coli* o *Tannerella forsythia* (Pham y col., 2010; Sauer y col., 2002), proporcionando protección frente a la actividad de agentes oxidantes.

En este mismo sentido existen indicios de que también actúa contra los biocidas la sobreexpresión de proteínas implicadas en los mecanismos de bombeo que expulsan de la célula compuestos tóxicos (*efflux pumps*), y que juegan un papel importante en la resistencia de los BF a los antibióticos (Gillis y col., 2005). Como se ha explicado en el apartado de QS, muchos de estos cambios están modulados por los sistemas de comunicación. De hecho, una cepa de *P. aeruginosa* mutante para *lasI*, incapaz de comunicarse mediante QS, no solo desarrolló un BF estructuralmente diferente, sino que también fue más sensible a la desinfección (Davies y col., 1998). Más reciente es el descubrimiento de la existencia en el BF de células persistoras. Estas células aparecen en una pequeña proporción de la población (del orden de 1 de cada 100.000) cuando esta es sometida a estrés; entonces detienen su proliferación y entran en un estado de alta protección, que una vez pasada la exposición al agente antimicrobiano desaparece, permitiendo a las células persistoras regenerar la población inicial (Harrison y col., 2005; Lewis, 2005). El hecho de que en los BF la proporción éstas en la población sea mayor que entre las células en suspensión, es un aspecto fundamental de la protección ejercida por los BF (Roberts y Stewart, 2005; Stewart, 2002).

En cuarto lugar, la transferencia horizontal de material genético (como plásmidos, transposones e integrones) que codifica genes implicados en mecanismos de resistencia como la síntesis de enzimas degradadoras de compuestos antimicrobianos, juega un papel muy importante en la resistencia a biocidas de los BF (Hannan y col., 2010; Kelly y col., 2009; Top y Springael, 2003). Precisamente, estos mecanismos de transferencia genética están favorecidos en los BF (Ando y col., 2009; Hausner y Wuertz, 1999;

Nguyen y col., 2010), por la elevada densidad celular, el alto grado de empaquetamiento y la presencia de estructuras específicas implicadas en estas acciones de transferencia. Determinadas mutaciones pueden dar lugar a la aparición de variantes en la población que expresan comportamientos fenotípicos distintos (Allegrucci y Sauer, 2007; Boles y col., 2004; Kirisits y col., 2005; Sauer y col., 2002) y que conducen en ciertos casos a la aparición de una subpoblación más resistente, que mejora la adaptación general de todo el BF a las situaciones amenazantes del medio en el que se encuentra. Boles y col. (2004) observaron cómo la variante rugosa (*wrinkly*) de *P. aeruginosa*, además de tener una mayor capacidad para formar BF, era más resistente al peróxido de hidrógeno, pues tras el tratamiento, la proporción de esa variante en el BF paso de un 12% a un 98%. En cuanto al origen de estas mutaciones, puede ser un proceso de error espontáneo durante la replicación o una respuesta frente a la presión de una situación de estrés para la célula.

En último lugar, como ya se ha comentado en el apartado anterior, las interacciones específicas desarrolladas entre las diferentes poblaciones de los BF multiespecie, pueden provocar la aparición de fenotipos únicos que sean más resistentes (Giaouris y col., 2013; Lee y col., 2014; Sanchez-Vizueté y col., 2015).

2.5.2 El fenómeno de la persistencia. Persistencia y persistores

Con anterioridad a este punto se ha mencionado el término persistencia en más de una ocasión. Antes de profundizar más en este fenómeno, conviene aclarar una posible confusión de conceptos. En los BF se encuentran células persistentes y células persistoras o persistores. Estos 2 términos, pese a su proximidad ortográfica, son ciertamente distantes en su significado.

Cuando se habla de células persistentes se hace referencia a esa parte de la microbiota (unas cuantas cepas) que se pueden aislar repetidamente en una instalación a lo largo del tiempo, ya sea por haberse apropiado de nichos inexpugnables o por contar con ventajas genéticas selectivas. Las células persistoras, son esa pequeña parte de la población, que se estima en 1 célula por cada 100.000 o cada 1.000.000, que surgen al exponerse la población a una situación de estrés y permanecen en estado latente o durmiente hasta que una vez concluida la exposición, pierden ese fenotipo y comienzan de nuevo a multiplicarse (Costerton y col., 1995; Gefen y Balaban, 2009; Lewis, 2005; Lewis, 2010).

Al final, en ambos casos, su presencia supone un problema grave pues dificulta su control y favorece el mantenimiento de una contaminación en las instalaciones, tanto hospitalarias como de la industria alimentaria. Los mecanismos que rigen la existencia y supervivencia de estas poblaciones microbianas son aún desconocidos. En este apartado, se utilizará el concepto de persistencia para referirse a las células persistentes

(muestreables de forma recurrente) y el término células persistoras o persistores para hacer referencia a la subpoblación durmiente durante el estrés.

2.5.2.1 Persistencia: presencia a lo largo del tiempo

La persistencia se diferencia de la resistencia en que no siempre se transfiere a la descendencia. De hecho, muchos autores piensan que la persistencia es circunstancial y que una cepa persistente en una planta no tiene por qué serlo en otra (Abdallah y col., 2014). Independientemente de esto, lo que sí es relevante es que muchos patógenos capaces de hacerse persistentes en instalaciones alimentarias y capaces de crecer en refrigeración, forman BF, pudiendo transferirse a los alimentos RTE. Durante el periodo de vida útil de estos productos los microorganismos pueden multiplicarse, alcanzando dosis infectivas en el momento del consumo.

Aunque no se sabe a ciencia cierta qué factores hacen que determinadas cepas persistan en algunas plantas de procesamiento de alimentos, la cooperación entre especies que se da en los BF multiespecie y que se ha desarrollado en el apartado 2.4.3 *Interacciones ecológicas. Amigos y enemigos*, parece que podría favorecer el atrincheramiento de una cepa en un lugar particularmente propicio (Bridier y col., 2015).

En el caso de *Lm*, se ha escrito mucho sobre los posibles mecanismos implicados en su persistencia. Sin embargo, pocos resultados concluyentes se han encontrado en este sentido. Por un lado, hay trabajos que no han encontrado diferencias entre cepas persistentes y esporádicas en cuanto a propiedades que podrían estar relacionadas con su capacidad de persistir (Harvey y col., 2007; Kastbjerg y Gram, 2009; Porsby y col., 2008). De hecho, como ya se ha apuntado, algunos autores como Carpentier y Cerf (2011) y Ferreira y col. (2014), establecen que no es una propiedad única de las células de *Lm* lo que les hace ser persistentes sino más bien nuestra incapacidad para retirarlas eficazmente de las plantas de procesamiento lo que contribuye a su mantenimiento.

Por otro lado, hay autores que han encontrado potenciadas, en cepas persistentes de *Lm*, habilidades como la capacidad para formar BF (Borucki y col., 2003; Lundén y col., 2000; Norwood y Gilmour, 2001), adaptarse a situaciones de estrés (Lundén, Tolvanen, y Korkeala, 2008) o resistir a los tratamientos de limpieza y desinfección (Aase y col., 2000). Además se ha descrito que algunas cepas persistentes de *Lm* se recuperan más rápido tras la acción de biocidas (Orgaz y col., 2013). Cabrita y col. (2014) por otra parte, han encontrado cambios en el exoproteoma inducidos por las bajas temperaturas en distintas cepas de *Lm*. Este estudio sugiere que existe un patrón diferente de adaptación a situaciones de estrés por frío entre cepas persistentes y no persistentes o esporádicas cultivadas a 11 °C. En concreto, la cepa persistente aislada de una industria quesera utilizada en ese trabajo, mostró un nivel superior de transcripción de *sigB*, gen que codifica al factor sigma B, que como veremos interviene en la respuesta frente a estrés general en *Lm*. Aunque otros autores han sugerido un papel importante de la

movilidad de *Lm* en su persistencia, Cabrita y col. no encontraron correlación entre la movilidad y la persistencia.

Parece pues posible que un impedimento para comprobar las hipotéticas ventajas selectivas sea la comparación de colecciones distintas. Otro obstáculo puede ser una falta de definición en el concepto de persistencia (Carpentier y Cerf, 2011), o más bien una falta de estandarización de los protocolos de aislamiento de este tipo de cepas (Ferreira y col., 2014). Si se define la persistencia como la supervivencia y presencia a lo largo del tiempo en un ambiente natural (alimentos) o construido por el hombre (industria alimentaria), es preciso garantizar un adecuado poder discriminatorio de los criterios para evaluar las muestras recogidas a lo largo del tiempo. En este sentido, es también importante que la metodología sea capaz de diferenciar entre una persistencia real o una reintroducción.

En definitiva, aunque estas cepas tengan características intrínsecas especiales, el crecimiento en BF de *Lm* en compañía de otras especies, establecidos en nichos dentro de las industrias alimentarias, podría ser un factor determinante de su persistencia en dichos entornos.

2.5.2.2 *Persistores: durmientes que despiertan*

Como ya se ha mencionado, entre el 0,001 y el 0,0001% de las células de una población pueden llegar a ser persistoras, durmientes capaces de sobrevivir a los tratamientos con antibióticos y biocidas. A diferencia de las células resistentes, también capaces de sobrevivir a estos tratamientos, las células persistoras son genéticamente exactas (isogénicas) a las células susceptibles. Su proporción con respecto a la población total parece estar influenciada por la fase de crecimiento de la misma, siendo mínima durante la fase exponencial de desarrollo y máxima en la fase estacionaria. Su aparición, que es objeto de intenso estudio, parece responder a una selección probabilística, es decir, al azar o por mecanismos aún desconocidos, pero también a cambios en el ambiente que rodea a la célula. Así, la activación de las respuestas SOS en células de *E. coli*, ocasionadas por el tratamiento con antibióticos como la ciprofloxacina, desencadena la aparición de células persistoras (Schopf y col., 1983). También algunas señales de QS parecen estar implicadas en este fenómeno. En concreto, el indol favorece el aumento de la población persistora en cultivos de *E. coli* (Vega y col., 2012). Por otra parte, en cultivos multiespecie se ha identificado una señal de QS que también favorece la inducción de células persistoras en *S. mutans* (Leung y Lévesque, 2012).

Una mayor abundancia de células persistoras en los BF probablemente esté favorecida por el hecho de que la concentración de las señales de QS esté aumentada y porque un número elevado de células se encuentren en estado estacionario. Se cree que la presencia de esta subpoblación en los BF está asociada con las infecciones crónicas y con la dificultad para erradicar algunas contaminaciones en superficies en contacto con

alimentos. En este contexto, en ocasiones, tras la aplicación de los tratamientos de limpieza y desinfección, se registra un aparente buen resultado que cambia pasadas unas horas, habiéndose repoblado los BF y recuperado los niveles iniciales de la contaminación. Orgaz y col. (2013), observaron este fenómeno al tratar con quitosano BF puros de 12 cepas diferentes de *Lm* de origen alimentario. Todas fueron capaces de recuperarse, pero las 6 que habían sido aisladas de manera repetida de la instalación, lo hicieron con mayor rapidez.

La persistencia de determinadas cepas a lo largo del tiempo en una instalación está, como ya se ha mencionado, posiblemente asociada a factores extrínsecos (*i.e.* lugares protegidos, microorganismos “amigos”, etc.) y a características intrínsecas (*i.e.* respuesta a estrés, capacidad de reparación), a lo que hay que sumar la inducción de células persistoras.

2.5.3 Las bajas temperaturas

Una de las barreras para el control de los microorganismos en la industria alimentaria es la aplicación de bajas temperaturas. Como se ha comentado en el apartado 2.3.1 *Equipos presentes en la industria alimentaria*, el frío es esencial para algunas industrias como las cárnicas, en las que su uso está generalizado.

Sin embargo, algunos microorganismos y en concreto algunos patógenos como *Lm*, destacan por su capacidad para adaptarse y crecer a bajas temperaturas. *Lm* es capaz de crecer entre -0,4 y 45°C, aunque por debajo de los 4°C su crecimiento es muy lento (tiempos de generación entre 12 y más de 50h) (Lou y Yousef, 1999). La exposición de un microorganismo a temperaturas reducidas es un tipo de estrés ambiental, el estrés por frío, que se presenta cuando ocurre un descenso repentino de la temperatura de más de 10°C (Mackey, 2000).

2.5.3.1 Respuesta al frío en *Listeria monocytogenes*

Cuando una bacteria se expone a bajas temperaturas debe afrontar una serie de problemas, como la disminución de la fluidez de la membrana que limita la disponibilidad de nutrientes, así como modificaciones (enrollamientos) en el DNA que dificultan su replicación y transcripción, aparición de estructuras secundarias en el RNA que afectan a la traducción, reducción de la actividad enzimática y alteraciones en el plegamiento de las proteínas y el funcionamiento de los ribosomas (Graumann y Marahiel, 1999). Para ello las bacterias psicrótrofas, y de distinta manera las psicrófilas, aumentan dramáticamente la síntesis de proteínas de choque por frío (*Cold Shock Proteins, CSP*) y restringen en mayor o menor medida la síntesis de las demás proteínas. Estas *CSP* desempeñan funciones específicas, entre ellas, la de inducir la expresión de transportadores de membrana o actuar como chaperonas del RNA, uniéndose a él hasta que comienza la traducción en el ribosoma (Hunger y col., 2006; Jiang y col., 1997)

evitando la aparición de estructuras secundarias que impiden la traducción. En *Lm* sometidas experimentalmente a estrés por frío, se han encontrado entre 12 (Bayles y col., 1996) y 38 *CSP* (Phan-Thanh y Gormon, 1995), en función de las condiciones experimentales de cada estudio. Algunas de estas proteínas se han descrito también en otras especies relacionadas con *Listeria* spp., como el gen *fri*, que codifica para ferritina y se ha identificado en *Listeria innocua* (Bozzi y col., 1997). Aparte de la inducción de la expresión de las *CSP*, otros mecanismos adicionales participan en la respuesta al frío. De hecho hay algunos autores que defienden que las modificaciones en determinados aminoácidos de la secuencia de ciertas proteínas, son clave para explicar la adaptación al frío más rápida encontrada en algunas cepas (Arguedas-Villa y col., 2014). Estos cambios supondrían una conformación espacial más flexible y más eficiente a bajas temperaturas.

Para resolver el problema de la escasa fluidez de la membrana, se ha descrito que a bajas temperaturas *Lm* utiliza la α -ceto deshidrogenasa, que hace disminuir la abundancia de ácidos grasos de la forma *iso* y aumentar la de los *anteiso* (Nickel y col., 2004; Zhu y col., 2005); también se registra en esos casos un acortamiento de la cadena de los ácidos grasos. Como transportadores específicos, los transportadores ABC (Angelidis y col., 2002; Beumer y col., 1994; Gerhardt y col., 2000; Ko y col., 1994; Wemekamp-Kamphuis y col., 2004) y otros sistemas de péptidos contribuyen también a la adaptación al frío de esta bacteria, facilitando la entrada de solutos y oligopéptidos al interior de la célula. Estos transportadores de oligopéptidos permiten la entrada de moléculas de más de 3 residuos. Están codificados en el operón *opp* que incluye 5 genes: *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* y *oppF*. Como respuesta al frío, el *oppA* es el que se encuentra principalmente activado (Borezee y col., 2000). Para moléculas de hasta 2 o 3 residuos, un sistema acoplado a una bomba protón motriz, codificado en el gen *dtpT* (Wouters y col., 2005), parece ser activado bajo estrés por frío.

También participando en la adaptación al frío se encuentran las llamadas DEAD box RNA helicasas, que se unen a unas regiones concretas de los genes evitando los enrollamientos que se forman en el RNA debido al frío, facilitando así su traducción. En células de *Lm* creciendo a 4°C, se ha descrito un mayor nivel de transcripción de 3 de estas helicasas (*lmo1722*, *lmo0866* y *lmo1450*) en comparación con el existente en células cultivadas a 20°C (Azizoglu y Kathariou, 2010; Chan y col., 2007; Markkula y col., 2012).

La regulación de esta respuesta ocurre tanto a nivel transcripcional, como a nivel de la traducción. En el primer caso, los factores sigma juegan un importante papel como modulares de la expresión de los genes que a su vez regularán o llevarán a cabo directamente funciones necesarias para soportar determinadas situaciones que se producen a bajas temperaturas (Chaturongakul y col., 2008). En *Lm* se han descrito 5 factores sigma: σ^A , σ^B , σ^L , σ^C y σ^H . El más estudiado, el σ^B , parece estar implicado en la

adaptación al estrés por frío entre otros muchos tipos de estrés (Ferreira y col., 2001; Fraser y col., 2003; Moorhead y Dykes, 2004; Wiedmann y col., 1998). Posiblemente, también el σ^L , menos estudiado, pueda tener un papel, adaptando el metabolismo del carbono y de los aminoácidos (Arous y col., 2004). Aparte de los factores sigma, se están estudiando los sistemas de regulación de 2 componentes capaces de detectar cambios en el entorno a través de un sensor en la membrana. Sin embargo, aún no está claro su implicación en la adaptación al frío de *Lm*. La regulación a nivel de traducción está menos estudiada, pero muy posiblemente los llamados "termómetros de RNA" (Krajewski y Narberhaus, 2014), capaces de regular la traducción de fragmentos transcritos de RNA en respuesta al descenso de la temperatura, tengan una función importante en la adaptación al frío de *Lm*.

Cabe decir, que en todos estos procesos hay importantes diferencias a nivel de cepa (Pieta y col., 2014). Por ejemplo, un estudio que comparó cepas de origen animal o alimentario con otras de origen clínico, encontró que las *Lm* de origen alimentario respondían mejor al estrés por frío que las de origen clínico. Este hecho fue atribuido a que por las características de sus matrices de origen, las cepas de origen alimentario ya habían sido expuestas a un estrés, de este tipo u otro, que activó rutas similares, otorgándoles una ventaja (Durack y col., 2013). Así, una mayor capacidad para afrontar situaciones desfavorables puede proporcionar a ciertas cepas una ventaja competitiva y un mejor acceso a nutrientes, frente a otras cepas u otros microorganismos presentes en el ambiente, pudiendo ser este uno de los factores que contribuyen a la persistencia de determinadas especies en el entorno alimentario.

En definitiva, aunque se han identificado muchos mecanismos moleculares implicados en esta respuesta adaptativa, aún queda un camino por recorrer para comprender cómo se articulan y regulan en su totalidad los procesos que permiten a *Lm* el crecimiento a bajas temperaturas, así como los factores que pueden limitarlo. Estos conocimientos deben contribuir a un control eficaz del problema de *Lm* en la industria alimentaria.

2.5.3.2 Efecto del frío sobre la formación de biofilms

Son escasos los estudios que evalúan el efecto del frío sobre la formación de BF, sus características y comportamientos, ya que es difícil comparar BF desarrollados a diferentes temperaturas. Al variar la temperatura, el desarrollo del BF se modifica (en términos de densidad celular, producción de matriz, etc.), debido a que la reducción de la tasa de crecimiento va acompañada de otros muchos procesos ligados al descenso de la temperatura. Por ejemplo, es difícil determinar qué periodo de incubación de un BF a 4°C sería equivalente o comparable a 24h a 20°C. La diferencia en tasa de duplicación de las células planctónicas, no es un criterio evidente. Esto conlleva que algunos resultados encontrados en la bibliografía no sean concluyentes.

Algunos trabajos se refieren a la formación de BF a bajas temperatura de diversas especies o cepas. Visvalingam y Holley (2013) observaron que la formación de BF de *E. coli* O157:H57 a 4°C fue mayor en cepas previamente adaptadas al frío (15 y 6°C) que en las no adaptadas. Di Bonaventura y col. (2008), evaluaron la adhesión a varias temperaturas (4, 12, 22 y 37°C) de 44 cepas de *Lm* sobre diversos materiales comunes en la industria alimentaria, concluyendo que no había diferencias en función del linaje (I, II, III) y que las diferencias observadas podrían ser debidas a estados de desarrollo diferentes.

Parece claro pues que los microorganismos pueden formar BF a bajas temperaturas y que los procesos de formación de estos pueden tener sus peculiaridades. Hay una tendencia en señalar la posible relación entre las modificaciones en la superficie de las células ocurridas como respuesta a las bajas temperatura, con cambios en hidrofobicidad que podrían afectar a la formación de BF (Di Bonaventura y col., 2008). Un estudio del perfil de ácidos grasos de la membrana de células de *Lm* procedentes de una muestra de salmón ahumado congelado durante 10 meses, mostró una disminución en las formas *anteiso* (ramificadas) de los ácidos grasos y un aumento de los ácidos grasos lineales (C16:0, C17:0 y C18:0). Estos cambios aumentaron la hidrofobicidad de la membrana, a la que se atribuyó la mayor adhesividad encontrada en las cepas sometidas al estrés (Miladi y col., 2013). Estos autores también analizaron mediante AFM las muestras, observando una reducción en el tamaño de las células y una variación hacia formas cocoides, cambios que también podrían afectar a la adhesividad de estas células. En la misma línea, Ells y Hansen (2006) evaluaron la tenacidad de la adhesión de células cultivadas a 10, 20 y 37°C. Observaron que cuanto menor era la temperatura de desarrollo de los BF, más difícil era desprenderlos.

Además de los cambios a nivel de superficie, algunas modificaciones en la cantidad y calidad de las EPS que forman la matriz parecen tener cierta relación con la estructura de estos BF fríos. Algunos autores han sugerido que una mayor cantidad de EPS en el BF podría traducirse en una mayor fuerza de adhesión al sustrato, a menor temperatura de incubación (Mai y Conner, 2007). Esto pudiera tener relación con la menor susceptibilidad frente a desinfectantes y otras situaciones de estrés, observada en los BF desarrollados a bajas temperaturas. De hecho, en bacterias marinas, adaptadas a las bajas temperaturas, se ha descrito una mayor producción de EPS, rico en ácido urónico (Jeong y col., 2014). A las EPS en estas bacterias se les ha atribuido un papel crioprotector. En el contexto de la industria alimentaria, un estudio que evaluó la capacidad para desarrollar BF de *Lm* sola o en cultivo mixto con *P. aeruginosa*, a 12 y 37°C, observó una menor susceptibilidad de *Lm* al tratamiento con desinfectantes cuando se desarrolló a 12°C y más aún en compañía de *P. aeruginosa* (Lourenço y col., 2011). Estos autores, aunque no evaluaron la cantidad o calidad de las EPS producidas, sugirieron que las modificaciones causadas en ellas por el frío podían ser el motivo de las diferencias en susceptibilidad encontradas.

En definitiva, es esperable que el frío modifique las características del BF en concreto, los aspectos relacionados con la matriz, la estructura y por ello la respuesta al entorno. Dichas modificaciones parecen favorecer la protección de las células albergadas en ellos frente a situaciones de estrés. Por esta razón, algunos autores (Lourenço y col., 2011) insisten en señalar que los estudios que evalúen la respuesta de las células adheridas frente a desinfectantes utilizables en el contexto de la industria alimentaria, deberían utilizar BF que han sido desarrollados bajo condiciones de estrés por frío.

3 CONTROL DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Como se dijo al principio de esta memoria, los BF podrían ser considerados como el primer y más exitoso signo de vida en la Tierra (Schopf y col., 1983). Llevan miles de millones de años adaptándose a multitud de situaciones de estrés (metales, biocidas, irradiaciones, antibióticos, etc.) a través de estrategias eficaces y versátiles para lograr la supervivencia. Por tanto, a la hora de diseñar estrategias para combatirlos, conviene partir de la base de que “el BF siempre gana” y es solo cuestión de tiempo el que vuelva a establecerse en la superficie de la que había sido eliminado.

Debido al impacto negativo de la presencia de BF en la industria alimentaria, el interés por la búsqueda de estrategias que puedan emplearse eficazmente para prevenir y controlar los BF en las plantas de procesado de alimentos ha sido, desde hace años, muy destacable. En general, el abordaje de la lucha contra los BF debe, para que sea eficaz, ser integral y continuado en el tiempo. Es decir, no cabe esperar una herramienta única que aplicada una sola vez logre erradicar los BF. Es más fácil que varias estrategias aplicadas conjuntamente y a lo largo del tiempo logren minimizar las consecuencias negativas provocadas por la formación de BF (Flemming, 2011).

De manera global, la lucha contra los BF en la industria alimentaria, se suele organizar en 3 actuaciones diferentes, necesarias cada una de ellas para poder lograr un resultado positivo. En primer lugar se debe prevenir la formación de BF, inhibiendo la adhesión de los microorganismos a las superficies y equipos (*i.e.* higiene de manipuladores, superficies e instalaciones que no favorezcan la adhesión). En segundo lugar, se deben aplicar procedimientos de limpieza que impidan el crecimiento de los BF (*i.e.* limpieza para minimizar nutrientes y microorganismos presentes) y por último, se deben emplear acciones que eliminen los BF maduros que hayan podido desarrollarse (*i.e.* desinfectantes y otros). Recientemente, algunos autores (Flemming, 2011) insisten sobre la importancia de vigilar la colonización de las superficies. Así, podría hablarse de una cuarta actuación que sería la vigilancia.

A continuación se explican los métodos que pueden utilizarse para llevar a cabo estas actuaciones, diferenciando entre los tradicionalmente usados y las nuevas alternativas propuestas, algunas de ellas, todavía en fases de investigación.

3.1 ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

La base de cualquier estrategia de prevención es la aplicación de unas buenas prácticas de higiene que minimicen la presencia de microorganismos y de nutrientes en la industria alimentaria. Estas medidas deben incluir desde el diseño de las instalaciones y equipos (evitando zonas de difícil acceso), su mantenimiento y limpieza, la elección de los materiales y la higiene de los manipuladores. Implementar métodos específicos para la prevención de los BF, es sin embargo, una necesidad en la industria alimentaria.

3.1.1 Monitorización

El impacto de la presencia de BF en las instalaciones alimentarias tanto por los riesgos asociados a salud humana como por la alteración de productos y procesos, ha hecho que aumente la necesidad de una técnica de detección de células adheridas rápida y sensible. En la industria alimentaria la mayoría de las superficies que pueden presentar BF son, con frecuencia, zonas de difícil acceso y el muestro de la fase líquida en contacto con las superficie no sirve de manera eficaz para valorar el nivel de contaminación (Flemming, 2011). Así, debido a la falta de métodos para la detección precoz de microorganismos adheridos, la presencia de BF es a menudo solo contemplada cuando los fallos en procesos y/o las contaminaciones en los productos ocasionados por su presencia son ya un problema real (Strathmann y col., 2013).

Una vez formados los BF, la actuación eficaz de las herramientas de control es bastante más difícil, pues durante el tiempo que ha pasado hasta que ha sido percibido el BF, este ha ido consolidándose y adquiriendo capacidad para adaptarse a las circunstancias adversas encontradas en esa localización, incluidas las propias estrategias de limpieza y desinfección aplicadas. Por tanto, poder actuar antes, permitiría un control más sostenible y eficaz. Para que esa detección precoz sea posible, son necesarios sistemas de monitorización, que poco a poco van ganando importancia en este contexto.

Los sistemas de detección temprana de BF se basan en la instalación en determinados puntos conflictivos de la planta, de sensores que generan información de forma automática (Strathmann y col., 2013). Frente a estos nuevos sistemas de monitorización, los procedimientos usados hasta ahora incluyen tinciones específicas *in situ* y muestreos, mediante torundas o cupones depositados en la superficie, a intervalos de tiempo establecidos para cada caso, para obtener el recuento de células viables, comúnmente mediante técnicas de siembra tradicionales. Sin embargo, algunos autores creen que no son una buena opción. Por un lado, no todo el BF puede ser muestreado

(Olsson y col., 2006) además de que, una buena parte de la población englobada en el BF, se encuentra en un estado metabólicamente inactivo o durmiente, no cultivable. En definitiva, estaría infravalorándose la contaminación, pues solo se estaría contemplando la “punta del iceberg”. Por otro lado, existen kits comerciales que tienen el problema de dar bastantes falsos positivos, en concreto, para *Lm* (Schirmer y col., 2012), por no mencionar el tiempo de espera necesario en este tipo de muestreos. La cuantificación directa de los microorganismos de una comunidad compleja mediante DNAarrays es una de las posibilidades disponibles en la actualidad que evita algunas de estas infravaloraciones. Otra opción sería la aplicación de la proteómica; la identificación de proteínas asociadas a la formación de BF, podría aportar en un futuro, nuevas estrategias para su control (Gasó-Soka y col., 2010; Wu y col., 2013).

El objetivo al que hay que tender es un sistema de monitorización continuo, automatizado, de rápida respuesta, fácil mantenimiento e interpretación, que provea información on-line, *in situ* y a tiempo real (Flemming, 2011). En cuanto a la información que proporcionan, se distinguen 3 niveles. El nivel 1 detecta cinética de deposición y variación del grosor, pero no diferencia si la deposición es de naturaleza biótica o abiótica. Los de nivel 2, diferencian entre biótica o abiótica y los del nivel 3, proporcionan información detallada sobre la composición química del depósito o los microorganismos. Algunos ejemplos de dispositivos de nivel 3 son la espectroscopía FTIR-ATR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Attenuated Total Reflectance*) en célula de flujo y las imágenes obtenidas por RMN para identificación de depósitos en tuberías y medios porosos (Strathmann y col., 2013).

3.1.2 Modelos matemáticos

El primer modelo matemático que describía las interacciones microbianas en un BF fue propuesto en 1986 (Wanner y Gujer, 1986). Más adelante, basándose en este primer modelo, Alpkvist y col. (2007), diseñaron uno continuo, mucho más complejo.

Si la monitorización hace posible vigilar los puntos críticos en cuanto a formación de BF en las instalaciones de una planta de procesamiento de alimentos, los modelos matemáticos permiten predecir el desarrollo de BF en lugares determinados. Con ellos se podría disminuir el riesgo de las contaminaciones por transferencia, así como ajustar adecuadamente el tiempo entre ciclos de limpieza, evitando pérdidas y optimizando los recursos, con el consecuente ahorro económico (Cappitelli y col., 2014). Aunque estas aplicaciones están aún en una fase muy inicial de desarrollo, puede que en el futuro, contribuyan a un mejor control de los BF en las industrias que procesan alimentos.

3.1.3 Materiales funcionales. Revestimientos

Dado que los BF se establecen sobre sustratos, una medida clara de prevención es actuar sobre las superficies con las que contactan los microorganismos. Elegir o diseñar

una superficie que no favorezca la adhesión, que se ensucie poco y se limpie bien, es esencial para abordar el control de los BF. En este punto se plantean básicamente 2 tipos de actuaciones posibles. Por un lado, se puede modificar la superficie para tratar de minimizar las posibilidades de adhesión. Por otro lado, se pueden usar las superficies como fuente de algún compuesto que va a inhibir a los microorganismos y por tanto su adhesión.

En el primer caso, la modificación de las propiedades superficiales asociadas con la formación de BF es una de las estrategias utilizadas. Por ejemplo, el diseño de materiales con modificaciones en el nivel de hidrofobicidad (Lin y col., 2011), la topografía (Verran y Whitehead, 2005), la energía libre, o la capacidad de adsorción de proteínas (Banerjee y col., 2011). En el segundo caso, la estrategia suele consistir en recubrir las superficies con materiales o pinturas que incorporan un compuesto activo que se libera durante las operaciones de limpieza. Estos compuestos activos son principalmente antimicrobianos. En la industria marina y en la biomédica se han usado pinturas y recubrimientos con arsénico, plata, óxido de cobre, óxido de mercurio y óxido de zinc como agentes *antifouling*/antiensuciamiento (Yebra y col., 2004).

Sin embargo, estas técnicas presentan ciertas limitaciones. Por un lado, el efecto es limitado en el tiempo, pues los compuestos que se liberan acaban agotándose. Además, los test con los que se evalúa la eficacia de estos revestimientos no utilizan condiciones realistas, obviando la población no cultivable presente en los BF, supone falsos negativos. Otro problema es que los revestimientos pueden quedar condicionados o cubiertos, tanto por compuestos presentes en el medio como por células inactivadas depositadas sobre las superficies. En cualquier caso, sin embargo, supondrían un alargamiento de la fase de latencia y ese tiempo en la lucha contra los BF puede ser una ventaja importante (Flemming, 2011).

En la industria alimentaria, hay que añadir los problemas de toxicidad que los compuestos antimicrobianos utilizados en estos recubrimientos podrían representar, ante el riesgo de migración a los alimentos. Además, el uso excesivo de esta tecnología podría permitir que las bacterias desarrollaran resistencia frente a los antimicrobianos empleados y se aumentara así el riesgo microbiológico (Abdallah y col., 2014). Sin embargo, la incorporación de compuestos bioactivos como péptidos antimicrobianos, biosurfactantes (Nitschke y Costa, 2007) o aceites esenciales a superficies en contacto con los alimentos, sí que se considera un método de prevención eficaz de los BF en la industria alimentaria. Por ejemplo, la surfactina producida por *B. subtilis*, ha resultado eficaz en la prevención de la adhesión de *S. enterica*, *E. coli*, y *Pseudomonas mirabilis* (Mireles y col., 2001). La técnica más aplicada consiste en la unión de estos compuestos a polímeros con los que se recubren las superficies en contacto con alimentos, haciéndolas resistentes a la colonización microbiana (Villa y col., 2009). Para resolver el problema del carácter temporal del efecto, se está evaluando la incorporación de los

compuestos en forma de nanopartículas (Lellouche y col., 2012), dando lugar a materiales antimicrobianos de larga duración. Estas técnicas de recubrimiento se están empleando también en el diseño de materiales destinados al envasado de los alimentos.

3.1.4 Biocontrol

En el contexto del control ecológico, es decir, la utilización de determinadas especies para ejercer un control sobre otras, también se han propuesto algunas estrategias válidas para la prevención de los BF en la industria alimentaria. Un método de este tipo se basa en el control que ejercen los BF desarrollados por bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Un ejemplo concreto es el de los BF de *Lactobacillus sakei* CRL1862 que han mostrado actividad antilisteria en superficies inertes para la industria cárnica (Pérez Ibarreche y col., 2014). Recientemente, otros autores han investigado el efecto de las bacteriocinas sobre la adhesión de los microorganismos (Pimentel-Filho y col., 2014), observando que concentraciones subinhibitorias de nisina y bovicina HC5 afectan a la adhesión. Además, parece que el tratamiento con bacteriocinas interfiere con la expresión de genes importantes para el desarrollo de los BF (*icaD*, *fnbA*, *clfB*, y *RNAIII*). Algunos autores apoyan el uso de bacteriocinas sobre superficies en contacto con alimentos, como una estrategia útil para la prevención de BF en la industria alimentaria, ya sea a través de la saturación de un BF con las bacterias productoras o a través de un dispositivo dispensador (Yamakami y col., 2013). Aunque estas investigaciones son todavía muy incipientes, parecen tener un gran potencial.

3.2 ESTRATEGIAS DE ELIMINACIÓN

3.2.1 Limpieza

Después de la vigilancia y la prevención, la limpieza es el siguiente paso para un buen control de los BF en la industria alimentaria. Los restos de materia orgánica en superficies y equipos durante el procesado de los alimentos son frecuentes en este tipo de instalaciones y su eliminación efectiva supone una estrategia simple y eficaz para reducir el nivel de microorganismos y nutrientes presentes en las instalaciones y para controlar la proliferación de bacterias y la formación de BF (Simões y col., 2010). El tipo de producto elaborado determina las características del residuo y junto a estas, las características de la superficie o del equipo han de determinar la tecnología utilizada para llevar a cabo la limpieza.

Dentro de la limpieza se diferencian 2 tipos: la limpieza mecánica y la limpieza química. Ambas son necesarias y se complementan. La limpieza mecánica de las superficies es el método antiBF más antiguo y posiblemente más eficaz. En cuanto a la limpieza química utiliza productos que de forma general se denominan detergentes. Se trata de compuestos o combinaciones de ellos, que en determinadas condiciones de tiempo, temperatura y acción mecánica, permiten eliminar la suciedad. Dentro de los

compuestos químicos que integran los detergentes se encuentran compuestos alcalinos, ácidos, neutros, oxidantes y secuestrantes.

Los álcalis están principalmente indicados para eliminación de suciedad de tipo orgánico (*i.e.* degradación no enzimática de proteínas y solubilización de grasas). El más usado es el hidróxido sódico o sosa. En cuanto a los ácidos, actúan como desincrustantes favoreciendo la eliminación de los depósitos minerales derivados de los alimentos, del agua o de las reacciones entre ambos. Pueden ser minerales (fosfórico, nítrico, sulfúrico, clorhídrico y sulfámico) u orgánicos (acético, láctico, cítrico, tartárico, succínico, glucónico y adípico) que a diferencia de los primeros destacan por ser no tóxicos y poco corrosivos. Los secuestrantes son compuestos orgánicos que fijan los iones responsables de la dureza del agua así como los metales, impidiendo que precipiten y formen depósitos en las superficies. Por último los oxidantes, que son más conocidos por su uso como desinfectantes, se incorporan en las formulaciones de detergentes por su función oxidante no selectiva, que permite disgregar materia orgánica difícil de eliminar. Los detergentes también incluyen a los surfactantes, moléculas anfipáticas con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, capaces de formar microemulsiones y que aportan a los detergentes propiedades emulsionantes, espumantes, humectantes, solubilizantes y dispersantes.

Gracias a los detergentes, la limpieza permite desalojar y arrastrar residuos endurecidos y/o adheridos a superficies y por eso va acompañada de un aclarado con agua para eliminar los residuos retirados. Es evidente que realizar la limpieza usando altas temperaturas favorece el resultado, pudiendo incluso contribuir a la inactivación de algunas células (Chmielewski y Frank, 2006). En cualquier caso, la limpieza tiene como objetivo eliminar los residuos propios de la actividad de la fábrica y, muy importante, disgregar la matriz asociada a los BF existentes, de manera que la labor posterior de los desinfectantes sea optimizada (Simões y col., 2006). Sin embargo, la limpieza no es por sí sola eficaz para controlar los BF pues como mucho, conseguirá retirar el 90% de las bacterias presentes en las superficies, pero no logra su muerte. Esto es importante. La limpieza, retira y arrastra pero no mata. Por ello empleada por sí sola, sin desinfección posterior, la limpieza puede agravar la situación pues los fragmentos de BF retirados pueden reanclarse a otras superficies y formar nuevos BF. De hecho, los aerosoles generados durante la limpieza y desinfección son conocidos por vehicular microorganismos a otras zonas, interviniendo en procesos de contaminación a veces insólitos. La desinfección es pues indispensable (Gram y col., 2007).

3.2.1.1 Cleaning-in-place

Los sistemas de limpieza CIP permiten la limpieza completa y automática de un sistema, normalmente cerrado, sin la necesidad de ser desmontado en sus consiguientes partes por mano del operario. Es muy usado para la limpieza de circuitos cerrados de

conducciones y depósitos. Este tipo especial de limpieza depende, además de los factores habituales en cualquier limpieza, de las condiciones hidrodinámicas (flujo, turbulencia). Con frecuencia, estos sistemas incluyen a continuación la etapa de desinfección. Los estudios realizados a escala de laboratorio establecen que la eficacia de estos sistemas depende de la cantidad de suciedad presente, del número de ciclos de limpieza programados, y el método utilizado. De hecho, dado que los sistemas CIP tradicionales usando agentes químicos parecen mejorables, el empleo de enzimas en este tipo de sistemas, es una opción a considerar (Lequette y col., 2010).

3.2.2 Desinfección

Como se decía en el apartado anterior, la limpieza no es por si sola un método eficaz para luchar contra los BF en la industria alimentaria. De hecho, la limpieza supone la selección de aquellos BF más recalcitrantes y más fuertemente adheridos. Por otro lado, los desinfectantes, tampoco logran un resultado eficaz por si solos, pues los restos de materia orgánica y la propia matriz de los BF dificultan su acceso hasta las células. Por tanto, en el abordaje del combate contra los BF, el sinergismo de acciones mecánicas y químicas tiene un papel importante y más efectivo que las acciones de un solo tipo, que lejos de ayudar, pueden empeorar la situación.

Existe una amplia variedad de sustancias utilizadas como desinfectantes. A continuación se exponen brevemente algunas de ellas, pero es importante tener en cuenta que no existe un desinfectante ideal sino que en cada caso particular, en función del tipo de microorganismo predominante, el tipo de superficie y la magnitud de los BF formados, hay que elegir el compuesto más idóneo. Entre los más usados en la desinfección de las plantas de procesamiento de alimentos se encuentran el hipoclorito sódico (NaHCl), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ozono, el peracético y los CUAT.

El hipoclorito sódico pertenece al grupo de los derivados clorados cuyo uso en desinfección es la práctica más clásica. En solución acuosa, este tipo de compuestos genera 3 especies moleculares activas: el cloro gas (Cl_2), el ácido hipocloroso (HOCl) y el anión hipoclorito (OCl^-). En función del pH predominará una u otra especie. Su espectro antimicrobiano es muy amplio y su mecanismo de acción radica en la alteración de la membrana citoplasmática debido al ácido hipocloroso. En concreto en el caso del hipoclorito sódico, la eficacia antiBF ha sido comprobada en diversas ocasiones (da Silva y col., 2011; Ozdemir y col., 2010). Tiene la particularidad de que es más efectivo a pH ácidos que a básicos (Araújo y col., 2011), pues a pH entre 4 y 5, la especie química predominante es el hipocloroso.

El peróxido de hidrógeno, perteneciente al grupo de los agentes oxidantes liberadores de oxígeno, es uno de los desinfectantes más ampliamente utilizados, debido precisamente a su elevado poder oxidante. Libera radicales libres que afectan a la matriz del BF, siendo probada su eficacia frente a BF. Aunque hay muchos trabajos

que han evaluado su acción a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, se ha comprobado que la exposición durante 15 min al 5% logra erradicar los BF (Robbins y col., 2005). Además, no se ha relacionado con reacciones alérgicas, ni con alteraciones en la calidad de los productos.

El ozono es otro compuesto con alto poder oxidante, resultante de la exposición de átomos de oxígeno a corrientes eléctricas de alto voltaje. Su mecanismo de acción se basa en la disrupción de la superficie de las células, provocando la pérdida del contenido intracelular. Diversos trabajos han demostrado su eficacia frente a bacterias y BF (Dosti y col., 2005; Lagrange y col., 2004).

El ácido peracético, resulta de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el ácido acético, caracterizándose por poseer muy bajo pH (2,8) y un fuerte poder oxidante. En esas propiedades se basa su poder desinfectante. También puede obtenerse por oxidación del acetaldehído. Puede ser descompuesto en residuos no tóxicos, lo que es conveniente de cara a su uso en la industria alimentaria. Aunque algunos estudios han comprobado su eficacia frente a BF de *Lm* (Frank y col., 2003; Cabeca y col., 2008) o *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Toté y col., 2010), otros sugieren que en comparación con otros desinfectantes, es poco eficiente (Królasik y col., 2010). Parece que el problema está en su escasa reacción con la matriz.

Están por último, los CUAT, que tienen propiedades surfactantes y actúan sobre los agregados lipoproteicos de la membrana citoplasmática. Tienen dificultades para actuar contra bacterias Gram negativas, pero esta limitación puede resolverse añadiendo secuestrantes, que desestabilizan la membrana externa de estas bacterias. Entre sus ventajas, son efectivos en un amplio rango de pH (6-10) y no son corrosivos. Su eficacia frente BF ha sido evaluada en varios estudios (Ebrahimi y col., 2015).

3.2.2.1 Otros factores a considerar en limpieza y desinfección

A la hora de diseñar la desinfección de una planta de procesamiento de alimentos, de cara al control de los BF, es importante tener en cuenta algunos factores. Tanto el tipo de desinfectante, su concentración, el tiempo de exposición así como el tiempo transcurrido entre cada ciclo de limpieza y desinfección, han de depender del tipo de BF que espera encontrarse, su edad, la/s especies que lo integran, la superficie de adhesión y las condiciones ambientales de pH y temperatura.

En cuanto a la edad del BF, que dependerá del tiempo transcurrido entre cada ciclo de limpieza y desinfección (desde el inicio de la contaminación hasta que se limpió), Sapers (2001) observó una mayor reducción de células adheridas de *E. coli* tras 30min de exposición a la contaminación que tras 24h. En este sentido, también hay que tener en cuenta la zona de la instalación que va a limpiarse. Por ejemplo, en una industria láctea los equipos se limpian y desinfectan varias veces al día, mientras que los suelos y

paredes se limpian con menos frecuencia. Así, en estas zonas las bacterias disponen de más tiempo para desarrollar BF (Simões y col., 2010).

En cuanto al material sobre el que se ha formado el BF, muchas investigaciones han mostrado que afecta a la eficacia del desinfectante (Wong, 1998; Pan y col., 2006), atribuyéndose este hecho a las propiedades hidrofóbicas y al acabado superficial del material. En cuanto a la composición del BF, ya se ha hablado en extenso sobre la protección que las células experimentan dentro del BF y de cómo la compañía de otras especies, o la exposición a situaciones de estrés incrementan esta protección. Es por eso importante destacar que por muy bien que se diseñen los procedimientos de limpieza y desinfección, teniendo en cuenta los factores arriba mencionados, siempre habrá un porcentaje de la población adherida que puede sobrevivir en las superficies y equipos de la planta. Estas células, incluso siendo menos del 1% de la población total existente antes de la limpieza y desinfección, pueden repoblar las superficies, reconstruyendo los BF (Flemming, 2011; Simões y col., 2010). Esta población, referida en otros apartados como persistente y persistora, expresa presumiblemente un elevado estado de protección, por lo que su transferencia implica un elevado riesgo (Hingston y col., 2013).

Dado que los métodos de desinfección en ocasiones resultan ineficaces para controlar los BF en las industrias alimentarias, métodos alternativos deben ser contemplados como combinación, o en sustitución de los tradicionales (Srey y col., 2013), además de un adecuado sistema de vigilancia.

3.2.3 Estrategias alternativas

3.2.3.1 Enzimas

La aplicación de enzimas como agentes de limpieza se remonta a mediados del siglo XX. Desde entonces hasta la actualidad se han introducido en la formulación de muchos de los detergentes producidos en los países desarrollados. Principalmente en los destinados a la industria textil. Su aplicación en la industria alimentaria no es tan lejana en el tiempo y tiene de ventaja que resultan una estrategia limpia que respeta el medio ambiente, pues no son tóxicas ni estables indefinidamente. Pero lo más interesante de las enzimas en el contexto del control de los BF, es su capacidad para disgregar la matriz. Precisamente, la amplia heterogeneidad de las EPS supone uno de los mayores retos a la hora de optimizar su eficacia. Por otra parte, el elevado coste de los enzimas disponibles comercialmente, es otro reto que esta estrategia tiene que superar para generalizar su empleo.

Para poder degradar eficazmente la matriz se requiere una combinación de varias enzimas (Simões y col., 2010). Lequette y col. (2010), evaluaron varias de ellas como agentes antiBF. En su trabajo mostraron que la eficacia de las enzimas depende de la especie formadora del BF, pues como ya se ha explicado, la naturaleza de la matriz

depende entre otros factores la de la especie/s y la cepa/s que compone el BF, pero también de las interacciones entre ellas y las condiciones ambientales. Esto es motivo de escepticismo por parte de algunos microbiólogos, al referirse al uso de enzimas para el control de BF. Por ejemplo, las serín proteasas parecen tener mejores resultados en BF de *Bacillus* que en aquellos de *Pf*, mientras que las polisacaridasas consiguen un mejor efecto sobre los BF de *Pf* que sobre los de *Bacillus* spp. (Lequette y col., 2010). Comúnmente, los preparados comerciales que ya están disponibles en el mercado incluyen mezclas, frecuentemente naturales, esto es extractos libres de células que contienen diversas enzimas. Una de las preparaciones más utilizadas contiene proteasas y amilasas. También existe en el mercado una combinación de polisacaridasas y oxidorreductasas para este fin.

Algunos autores dudan de la eficacia de la estrategia enzimática para la eliminación (o sea, limpieza y desinfección) de BF, aduciendo que su actividad es demasiado específica y lenta (Flemming y Wingender, 2010). Sí admiten sin embargo su potencial para desestabilizar la matriz. Por esta razón se emplean a veces como una etapa intermedia entre la limpieza y la desinfección, mejorando sensiblemente el resultado conjunto (Lequette y col., 2010). El eDNA, como se ha indicado con anterioridad, parece uno de los compuestos clave en el mantenimiento de la estructura de los BF. Así, se está convirtiendo en la molécula diana de los tratamientos con enzimas. Aunque es cierto que el coste comercial de la DNAasa es demasiado elevado para plantear su uso en la industria alimentaria, hay algunas nucleasas de origen microbiano que teniendo la misma función pueden reducir mucho los costes. Además, muy recientemente, se están investigando los compuestos de la matriz con los que interactúa el eDNA (Okshevsky y col., 2015), de manera que interferir en esas asociaciones podría ser otra estrategia eficaz para dismantelar los BF y facilitar el acceso de antimicrobianos (Fig. 3).

3.2.3.2 Quitosano

Este compuesto, conocido por su versatilidad, es un polisacárido obtenido mediante deacetilación parcial de la quitina. Las variantes comerciales, difieren en peso molecular y grado de deacetilación si proceden de quitina de origen animal. Existen también versiones sustituidas para uso como material para la construcción de, por ejemplo, prótesis clínicas. También hay quitosano fúngico comercial, aceptado como complemento alimentario y como producto fitosanitario. La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, formando parte del esqueleto externo de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos, insectos, etc.), moluscos y hongos. Se obtiene industrialmente a partir de los caparazones de crustáceos y las “plumas” (concha interna) de calamar u otros cefalópodos. A la quitina y a sus derivados se les han encontrado en los últimos años gran cantidad de usos, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica (Friedman y Juneja, 2010). La amplitud de sus aplicaciones, se beneficia también de que sea un compuesto

natural, biodegradable, biocompatible y no tóxico, barato y que aprovecha un subproducto de la industria alimentaria.

Desde el punto de vista químico, la quitina es un polímero formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlace $\beta(1-4)$. Su estructura es muy similar a la de la celulosa, a excepción de que los grupos hidroxilos en la posición 2 han sido sustituidos por grupos acetoamida. El quitosano es un heteropolisacárido con unidades de 2 azúcares comunes, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Del grado de deacetilación (que suele estar entre 75 y 95%) y del peso molecular (50-2000 KDa) dependen la viscosidad y el pKa. La deacetilación se realiza en caliente, con una solución de sosa (NaOH) o potasa (KOH). Este proceso nunca llega al 100% porque suele interesar conservar cierta proporción de N-acetil-D-glucosamina. En estado puro resulta poco soluble, por lo que suele solubilizarse en medio ácido, añadiendo un ácido orgánico o inorgánico que baje el pH por debajo de 6. Así, los grupos aminos se protonan, obteniéndose un polisacárido soluble, con una fuerte carga positiva.

Entre sus muchas propiedades destacan las antimicrobianas, actuando sobre un amplio espectro de microorganismos (Friedman y Juneja, 2010; Kong y col., 2010). Esta actividad ha sido atribuida principalmente, a los grupos amino primarios del quitosano, por lo que interesa el peso molecular y el grado de deacetilación. En cuanto al primero, las investigaciones apuntan que hace falta un mínimo de 10KDa para actuar sobre microorganismos (Raafat y col., 2008), aunque hay cierta disparidad de criterios al respecto (Kong y col., 2010). Por otro lado, parece que cuanto mayor es el grado de deacetilación, mayor es el poder antimicrobiano. Además, el tipo y fase de crecimiento del microorganismo diana, también afectan a la eficacia (Kong y col., 2010). Por ejemplo, las células microbianas al final de la fase exponencial de crecimiento parecen ser las más sensibles a la exposición al quitosano y los pH ácidos y una mayor temperatura intensifican la acción antimicrobiana (Tsai y Su, 1999). Además, las modificaciones en la fuerza iónica del medio también son a tener en cuenta pues pueden bloquear grupos amino reactivos.

Aunque no es aún un tema cerrado, se cree que el modo de acción del quitosano y sus derivados depende de su carácter policatiónico. Los grupos amino, protonados a pH ácido, interactúan con los componentes aniónicos de la superficie de las células, provocando modificaciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y pérdidas del contenido intracelular que comprometen la viabilidad celular o llegan a provocar la muerte (Helander y col., 2001; Jeon, 2001). Algunos autores sugieren también la posibilidad de que el quitosano entre en la célula, interactúe con el DNA, RNAm y altere la síntesis proteica (Harish Prashanth y Tharanathan 2007). Lo que más frecuentemente se ha estudiado sin embargo, son sus interacciones a nivel de la superficie (Muzzarelli y col., 1990; Raafat y col., 2008; Savard y col., 2002). La naturaleza de los compuestos que interactúan con el quitosano no está del todo definida, pues

hay poca investigación a nivel molecular. Podrían incluir a proteínas o fosfolípidos cargados negativamente (Liu y col., 2004; Li y col., 2010), aminoácidos (Kumar y col., 2005), al ácido teicoico en bacterias Gram positivas (Raafat y col., 2008) o a lipopolisacáridos cargados negativamente en Gram negativas (Helander y col., 2001). Algunos autores han descrito la capacidad del quitosano para formar poros (Kumar y col., 2005; Young y col., 1982). En cuanto a la posibilidad de interaccionar con compuestos intracelulares, Raafat y col. (2008) afirman que el tamaño de esta molécula es demasiado grande y que no hay evidencias de este tipo de mecanismo en bacterias. En definitiva, no parece tratarse de un mecanismo simple con un único compuesto diana, sino más bien el resultado de un conjunto de eventos que ocurren más o menos simultáneamente en diferentes puntos y con distintas posibilidades en cuanto a moléculas diana (Kong y col., 2010).

El potencial del quitosano, o los quitosanos, o los quitoderivados, incluyendo los quitoligosacáridos como agentes antiBF está siendo estudiado sobre todo en el área de la medicina y los resultados son muy satisfactorios. Martínez y col. (2010) han observado mediante SEM y CLSM alteraciones estructurales en los BF tratados con quitosano de *Cryptococcus neoformans*, un moho problemático para los inmunodeprimidos. Además, comprobaron que disminuía la actividad metabólica y la viabilidad celular, atribuyendo estos efectos a la interacción con la superficie. El tratamiento de BF en la cavidad oral con quitosano también está teniendo buenos resultados (Busscher y col., 2008; Costa y col., 2013). En concreto Costa y col., comprobaron que el tratamiento de *S. mutans* con quitosano inhibió la adhesión y la formación del BF, afectando también a BF maduros. Al aplicar el tratamiento sobre BF mixtos, los resultados fueron igualmente alentadores.

En el contexto de la industria alimentaria también se están llevando a cabo investigaciones con este polímero como estrategia de control de los BF. Un número considerable de trabajos lo están evaluando como agente para el recubrimiento de materiales de envasado (Carlson y col., 2008) y directamente de alimentos (Jiang y col., 2011). En este último estudio, lonchas de salmón ahumado inoculadas con *Lm*, se envolvieron durante su almacenamiento con quitosano, observándose una reducción en la población de *Lm*. En cuanto a su aplicación como agente de limpieza y desinfección de las superficies y equipos de las plantas de procesado, no se han realizado muchos estudios. Orgaz y col. (2011) probaron quitosano sobre BF mono especie maduros de varios microorganismos relevantes en la industria alimentaria obteniendo resultados muy positivos. En particular, 4 de los microorganismos utilizados en dicho estudio eran patógenos (*Lm*, *B. cereus*, *S. aureus* y *S. enterica*) y el cuarto fue *Pf*, una bacteria alterante ubicua en instalaciones alimentarias. Los resultados obtenidos variaban en función de la especie, siendo *Lm* la más susceptible y *S. aureus* el menos. Los autores atribuyeron estas variaciones a las diferencias entre las matrices de los BF de estos microorganismos.

Hasta ahora no se ha ensayado su eficacia en BF mixtos de interés alimentario, ni se ha profundizado en las bases del mecanismo de acción sobre BF. Su carácter policatiónico parece ser también en este caso un aspecto esencial. Para llegar a las células albergadas en el BF y poder actuar sobre su superficie es evidente que el quitosano o sus derivados deben de alguna manera penetrar y difundir en la matriz. Esta difusión posiblemente esté influenciada por su peso molecular y por eso los derivados de menor tamaño obtenidos de su hidrólisis enzimática (con pronasa o quitinasas) (Raafat y Sahl, 2009) han obtenido mejores resultados (Orgaz y col., 2011). Aparte de esta difusión por la matriz, dado su carácter policatiónico, parece también posible que el quitosano interaccione con los componentes de la matriz, seguramente con aquellos que tienen carga negativa, pudiendo quizás desmoronar así la estructura y favorecer el acceso a las células. De hecho, muy recientemente se ha observado que el quitosano favorece la eficacia de los antibióticos en el tratamiento contra BF (Zhang y col., 2013). Precisamente estos autores relacionan esta mejora con una mayor accesibilidad de los antibióticos al interior del BF, debido presumiblemente a la acción del quitosano sobre la matriz. Entre los componentes de las EPS que podrían interaccionar con el quitosano están algunos exopolisacáridos como los descritos en la matriz de *Pf* (Kives y col., 2006) o incluso el eDNA, que tiene carga negativa por los grupos fosfato (Das y col., 2013). Young y col. (1982), describieron la formación de poros en las paredes vegetales de pectina (ácido poligalacturónico), por la acción secuestrante del calcio que estabiliza el gel. De igual manera, el gel de la matriz puede ser desestabilizado por las propiedades quelantes del quitosano.

En definitiva, parece que a los mecanismos de acción propuestos para este antimicrobiano frente a células en suspensión, habría que sumarles, cuando se trate de BF, una serie de procesos que podrían tener lugar sinérgicamente o en paralelo: la difusión en la matriz, su interacción con componentes de la misma y su acción como quelante.

Es necesario averiguar el fundamento de la eficacia del quitosano como antimicrobiano y en concreto como agente antiBF, pero no hay duda de que se trata de un potente y ventajoso recurso para la lucha contra los BF en la industria alimentaria.

3.2.3.3 Bacteriófagos

Debido al aumento gradual de la resistencia a los antibióticos desarrollada por los microorganismos, el uso de bacteriófagos se considera en la actualidad como una alternativa con un fuerte potencial para tratar las infecciones bacterianas y en especial las provocadas por BF (Sadekuzzaman y col., 2015).

En el contexto de la industria alimentaria, los bacteriófagos también han sido propuestos como alternativa para el control de BF. Entre sus ventajas destacan que una vez destruidos, son respetuosos con el medio ambiente, su producción es sencilla y

barata, cuentan con un elevado nivel de especificidad y son rápidamente aislados. Dentro de las desventajas, destaca el problema de los residuos de endotoxinas que deja su aplicación.

Uno de los problemas que presentan los fagos en su lucha contra los BF, es la limitación de entrada en la matriz. Este obstáculo ha sido superado gracias al diseño y producción, mediante modificación genética, de bacteriófagos que expresan enzimas capaces de degradar la matriz de los BF, mejorando con ello su eficacia (Lu y Collins, 2007). No obstante, se ha estudiado la difusión-reacción de bacteriófagos en el interior de BF mediante espectroscopia de fluorescencia (*Fluorescens Correlation Spectroscopy*). Los resultados obtenidos sugieren que algunos bacteriófagos pueden llegar a infiltrarse en BF; allí son inmovilizados, amplificados, liberados por el ciclo lítico e interactúan con los receptores específicos de la bacteria (Briandet y col., 2008). Para la eliminación de *Lm* en superficies de la industria alimentaria, la empresa holandesa Microeos ha comercializado ListexTM P100, que contiene un bacteriófago aislado de los efluentes de una industria láctea. Este producto está considerado GRAS por la FDA y el USDA desde 2011 y aprobado como agente de procesado en la UE. Según la EFSA no presenta riesgo de toxicidad.

Algunos investigadores determinan que los fagos, por sí solos, no resultan eficaces y otros añaden que pueden incluso ser problemáticos, ya que la lisis celular que provocan podría promover la repoblación de los BF, pues las células que sobreviven al tratamiento pueden utilizar el contenido de las células lisadas como nutrientes (Brooks y Flint, 2008). Por eso, para mejorar su eficacia, parece una buena opción la combinación de esta estrategia con otras como por ejemplo, los desinfectantes (Zhang y Hu, 2013).

3.2.3.4 Inhibidores de los sistemas de comunicación quorum sensing

Los sistemas de QS, que han demostrados ser esenciales para la formación de los BF, se han convertido en una posible diana para su control. En concreto, estos sistemas pueden ser bloqueados mediante 4 mecanismos diferentes: inhibición de la síntesis de las moléculas señal; degradación de las señales; inhibición de la unión de la señal y el receptor; e inhibición de la cascada de traducción de la señal (Brackman y Coenye, 2015).

En el primer caso, varios estudios han mostrado que mutaciones genéticas que afectan a la síntesis de señales, afectan negativamente a la formación de BF. En la mayoría de los casos, las bacterias formaban BF defectuosos, inmaduros, carentes de microcolonias estructuradas (McCarthy y col., 2010; Udine y col., 2013). La manipulación de las señales podría pues ser una estrategia útil para el control de BF. En el caso del sistema AI-1, las señales AHL se forman por la transferencia del grupo acilo de un ácido graso al grupo amino de la S-adenosilmetionina (SAM). Los inhibidores de la síntesis de SAM o del ácido graso, podrían pues actuar como inhibidores de la síntesis de señales

AHL (Parsek y col., 1999). En el caso del sistema AI-2, el llamado universal, la síntesis de las moléculas señal incluye 2 reacciones enzimáticas. La primera catalizada por una nucleosidasa y la segunda, controlada por LuxS. Varios inhibidores de LuxS y de la nucleosidasa han sido descritos (Shen y col., 2006). Por último, en el caso de los sistemas de señales a base de péptidos, las proteínas implicadas en su síntesis también podrían ser en principio un buen objetivo para interferir en el QS. Sin embargo, todavía no se ha descrito ninguna. Sí que hay algunos trabajos que han descrito una reducción en la producción de estas señales por medio de determinados péptidos lineales que interfieren en la actividad de la peptidasa (Kavanaugh y col., 2007) pero no se ha probado su efecto sobre la inhibición de BF.

La segunda opción, consistiría en degradar las señales una vez producidas, evitando así su acumulación. A esta técnica se le ha llamado *quorum quenching*. Hay varios tipos de enzimas que cancelan las señales AHL: lactonasas, acetilasas, oxidadas y reductasas (que no degradan, sino que modifican la estructura y así la actividad) y paraoxonasas. Las primeras pueden ser producidas por varias especies bacterianas, en eucariotas e incluso en plantas. Las últimas se encuentran en mamíferos. No se ha descrito aún ningún sistema específico que degrade moléculas señal de los otros sistemas de QS. Sí se ha visto, sin embargo, que pueden ser afectadas por el sistema inmunitario (Chan y col., 2004; Park y col., 2007), aunque esa posibilidad es más lejana a la industria alimentaria.

En tercer lugar, la modificación de las AHL da lugar a moléculas análogas que interfieren eficazmente en la unión de las AHL con el receptor, pudiendo afectar así a la formación de BF. Ishida y col. (2007) demostraron que un análogo obtenido al sustituir el anillo de lactona por un anillo ciclopentil afectó significativamente a la formación de BF de *P. aeruginosa*. Aparte de estos análogos sintetizados por el hombre, se han identificado otros en la naturaleza, fundamentalmente en extractos de plantas. También se han identificado análogos capaces de interferir con las señales del sistema AI-2 y AIP. Sin embargo, hay poca información sobre su efecto antiBF. Uno de los inhibidores de QS de péptidos más investigado, el péptido inhibidor de RNAlII (RIP), sí que parece interferir en la formación del BF de *Staphylococcus* spp. (Kiran y col., 2008).

Por último, los sistemas QS pueden también ser bloqueados a nivel de la cascada de activación. Entre los compuestos más estudiados destacan las furanonas y el cinamaldehído, encontrados en la naturaleza y también obtenidos sintéticamente. Ambos han mostrado capacidad para interferir con diferentes tipos de sistemas de QS (Brackman y col., 2011; Defoirdt y col., 2007), afectando a la formación de BF de *S. enterica* y *E. coli*, entre otras muchas especies. Sin embargo, el uso de las furanonas está limitado por su toxicidad. El cinamaldehído, en cambio, es ampliamente usado como agente saborizante en bebidas y alimentos.

Parece pues, que esta alternativa, aunque su modo de interferencia con la formación, mantenimiento y dispersión de BF, así como otros aspectos de su posible aplicación en la industria alimentaria, necesitan ser más profundamente investigados, ha mostrado ser una prometedora posibilidad para el control de los BF (Brackman y Coenye, 2015).

3.2.3.5 Miscelánea

3.2.3.5.1 Fotosensibilización

Esta técnica ha sido también propuesta para el control de los BF en las superficies de la industria alimentaria. El método se basa en la aplicación combinada de un fotosensibilizador, una fuente de luz y oxígeno. Algunos estudios experimentales han conseguido eliminar $3,1 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ del BF de una cepa termosensible de *Lm* (Buchovec y col., 2010), y hasta $4,5 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ en BF con la misma cepa y otra termorresistente (Luksiene y col., 2010), en función del compuesto y la dosis utilizada.

3.2.3.5.2 Ultrasonidos

Esta técnica, ya empleada en otras operaciones higienizantes dentro y fuera de la industria alimentaria, podría constituir una ayuda a la eliminación de BF (Oulahal-Lagsir y col., 2000; Oulahal-Lagsir y col., 2003). Estos autores han descrito que las bajas frecuencias son bastante más eficaces que las altas, y que si bien su aplicación en superficies abiertas no presenta grandes dificultades, el uso en sistemas cerrados tiene serias limitaciones técnicas. Por tanto, aunque los ultrasonidos por sí solos resultan ineficientes para controlar la adhesión de bacterias en la industria alimentaria, se están estudiando combinaciones con otras estrategias, como el uso de desinfectantes, ozono, surfactantes, enzimas o quelantes.

3.2.3.5.3 Agua electrolizada

El agua electrolizada ha sido ensayada y propuesta como alternativa para el control de BF en la industria alimentaria (Kim y col., 2004). El potencial de este recurso se debe a su fuerte poder oxidante y a que contiene ion hipocloroso, que como se explicó en el apartado de los desinfectantes, es un compuesto con propiedades antimicrobianas.

3.2.3.5.4 Biosurfactantes

Los biosurfactantes o surfactantes de origen microbiano, son sustancias de bajo peso molecular producidas por microorganismos y caracterizadas por ser anfipáticas por lo que poseen la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial, entre moléculas individuales de la superficie o en la interfase. En su comportamiento como emulsionantes, dispersantes y espumantes, se basa su actividad frente a BF. En la composición química de la mayoría de los biosurfactantes pueden estar incluidos

glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, fosfolípidos o lípidos neutros (Sadekuzzaman y col., 2015).

En los últimos años, la evaluación de estos compuestos como alternativa a los agentes antiBF convencionales ha adquirido gran interés (Dusane y col., 2010; Rodrigues y col., 2006). Algunas de estas investigaciones muestran, que en condiciones determinadas, pueden conseguir incluso mejores resultados que estrategias más convencionales (Epstein y col., 2011). Su eficacia parece tener que ver con la capacidad para modificar la hidrofobicidad del sustrato e interferir en la adhesión de los microorganismos (Rodrigues y col., 2006).

3.2.3.5.5 Compuestos vegetales y miel

Ya en el siglo XIX se inició el interés por la evaluación científica de las propiedades antimicrobianas de muchas de las especias y hierbas naturales que desde los inicios de nuestra civilización se han usado para curar afecciones cutáneas o para conservar los alimentos. Sus propiedades antiBF no están siendo sin embargo examinadas hasta ahora (Sadekuzzaman y col., 2015).

Entre estos recursos se encuentran los aceites esenciales, sustancias volátiles obtenidas de plantas. Su uso en la industria alimentaria está recibiendo mucha atención por su efecto conservador y antibacteriano. Tienen potencial en este sentido el aceite de comino, de canela, de orégano (Nebahat y col., 2010) y de árbol del té, que se ha probado contra BF de *P. aeruginosa* en combinación con un antibiótico, en concreto ciprofloxacina. El aceite esencial de canela, ha sido evaluado sobre células adheridas de *Lm* sobre acero inoxidable (de Oliveira y col., 2012).

Además, diferentes extractos de plantas podrían tener un efecto inhibitorio sobre la formación de BF (Coenye y col., 2012). Entre los microorganismos frente a los que hay indicios de un posible efecto, se encuentran algunos de interés alimentario como *E. coli*, *Serratia* spp. o *Pf*.

Dentro de los compuestos de origen natural que están siendo evaluados por sus propiedades frente a BF, cabe destacar la miel. Este popular producto obtenido por las abejas a partir del néctar de las flores es conocido por su carácter antimicrobiano. Lee y col. (2011) han descrito que bajas concentraciones de miel reducen la formación de BF, afectando al QS y a la virulencia de *E. coli* O157:H7. A concentraciones superiores, parece que puede inhibir la adhesión, por sus propiedades antibacterianas. El mecanismo de acción es todavía escasamente conocido.

La información que se va haciendo disponible sobre la regulación del ciclo de vida de los BF y la complejidad asociada a las situaciones de estrés, las interacciones entre distintas especies microbianas etc., van haciendo posible la simulación de los BF reales

que se pueden encontrar en la industria alimentaria. Se puede ir así elaborando un inventario y una síntesis de los BF que sirvan de referencia para diseñar nuevos métodos de control. Un inventario, porque existen muchos tipos de BF y puede interesar el desarrollo de formas de control *ad hoc* para algunos de ellos. Una síntesis, porque conviene poder contar con sistemas de control que tengan una utilidad lo más general posible.

CAPÍTULO I

*Spatial Distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in Mixed Biofilms*

*Publicado en *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Capítulo 6, 115-131. Ed.; Nova Publisher (2014)*

No part of this digital document may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted commercially in any form or by any means. The publisher has taken reasonable care in the preparation of this digital document, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained herein. This digital document is sold with the clear understanding that the publisher is not engaged in rendering legal, medical or any other professional services.

Chapter6

SPATIAL DISTRIBUTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* IN MIXED BIOFILMS

C. H. Puga*, C. SanJose and B. Orgaz

Department of Nutrition, Food Science and Technology,
University Complutense of Madrid, Spain

ABSTRACT

The idea of primary colonization of surfaces by *Pseudomonas* as a requirement or a decisive step for *Listeria monocytogenes* (Lm) integration in biofilms (Sasahara & Zottola, 1993) has been of primary influence in food industry sanitation. The assumption has been that *L. monocytogenes* is not capable of sufficient EPS production to create biofilms on its own and that *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *fragi* or other species) are clearly superior in this respect and can provide a generous matrix able to host unobtrusive guests such as *Listeria*. For further insight into this classic 20-year-old topic, mixed biofilms with several strains of Lm and *P. fluorescens* (Pf) were obtained at room and refrigeration temperatures to be studied with confocal microscopy. Differential labeling of both species allowed identification of their respective location in biofilm structure. Both types of cells were separately quantified by plating in specific media. Co-culture benefits for Lm were confirmed in biofilms, particularly at 4°C, although not in planktonic cells. Besides, *Listeria* cells appeared preferentially located in the deeper, more anaerobic layers, with *Pseudomonas* cells placed on top of them. It is well known that bacteria in biofilms are better protected against various antimicrobial agents than planktonic cells; the protection is increased for cells in mixed biofilms and even more so when the cells are located in their deeper layers. The observed distribution pattern may guide the development of new and more effective cleaning and disinfection strategies to be used in food processing associated surfaces.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, mixed biofilms, spatial distribution, layering, CLSM

* E-mail: chpuga@pdi.ucm.es.

INTRODUCTION

Biofilms are communities of microorganisms embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) produced by themselves (Kjelleberg & Givskov, 2007; Karunakaran et al., 2011). This matrix is an adhesive gel that attaches to a surface and provides protection to the biofilms inhabitants (Flemming & Wingender, 2010). In the food industry context, this protection stands against sheer forces of flowing liquids and chemical action of tensoactives and biocides during cleaning and disinfection operations (Chmielewski & Frank, 2003; Fratomico et al., 2009; Srey et al., 2013; Valderrama & Cutter, 2013). When these operations do not achieve efficient biofilm elimination, the biotransfer of shed cells or biofilm fragments may contaminate raw materials or foods (Verran et al., 2008). This is more dangerous when the embedded cells are pathogens, as it is the case for Lm, when the contaminated food can support their growth during the storage and commercialization lifespan and when the foods do not receive further hygienic treatment, as in Ready To Eat (RTE) foods. When biofilm inhabitants are very active food spoilage agents, as it is the case of Pf, they tend to be widely widespread and abundant in food processing plants, having an impact not only on the product's organoleptic and preserving qualities, but also on different aspects of the plant's technological performance (Fratamico et al., 2009) and on costs of cleaning and disinfection. So, even if biofilms are pathogen-carrying or not, their eradication from food associated surfaces is a challenge for the food hygienist.

Pseudomonas sp. is a versatile and fast psychrotroph known to dominate the spoilage pace and pattern of protein-rich refrigerated foods (Huis in't Veld J. H. J., 1996). Pf is most prominent in milk dairy products, while *P. putida* and *P. fragi* are more commonly associated with meat products (Liao, 2006). *P. aeruginosa* has minor importance as a food pathogen, but it is obviously the best known *Pseudomonas* species (Silby et al., 2011) because of its role in cystic fibrosis; it is thus a reference for the whole gender. *Pseudomonas* biofilms have been extensively studied, not just for their clinical and food related relevance (Mettler & Carpentier, 1998; Mann & Wozniak, 2012), but as a convenient biofilm model (Lopez et al., 2010) due to rapid development, considerable thickness and rich structural complexity.

Pseudomonas interactions with *Listeria* were already studied in planktonic cultures in milk (Farrag & Marth, 1989) and special media (Buchanan & Bagi 1999). *Pseudomonas* protective role on surfaces was described very early (Breen et al., 1982). Observation of mixed biofilms of Lm strain Scott A and *P. fragi* served to draw the inspiring idea of *Listeria*'s utilization of a primary colonizer to enhance its attachment to food related surfaces (Sasahara & Zottola, 1993). *P. putida* and Lm have been found to actually coincide in real biofilms in the food industry (Hassan et al., 2004) and similar partnerships are likely to be common in the refrigerated food processing context.

Human listeriosis owes its "emergence", in the eighties of the twentieth century, to advances in food industry sanitation (Ryser, 2007). Before that, Lm was not able to achieve significant figures due to its poor competitive skills to face the resident microbiota, traditionally kept at much higher levels than now. Interestingly enough, some of the antagonistic mechanisms used by other organisms, such as lactic acid bacteria, are now attempted for Lm control without the use of biocides (Nilsson et al., 1999; Mariani et al., 2011). Additionally, certain food preservation conditions, such as refrigeration or multiple-hurdle strategies, have offered a unique chance for Lm to occupy "new" niches. Thus, from

the ecological point of view, the upsurge and persistence of this pathogen in the food chain is a remarkable case of manmade situation (Carpentier & Cerf, 2011; Valderrama & Cutter, 2013).

Many Lm strains have been tested in their ability to form monospecies biofilms in experimental conditions (Moretro 2004, Nilsson et al., 2011; da Silva et al., 2013). Their structure is very different from the more frequently described biofilm models, which are mushroom-like, such as those of *Pseudomonas* (Costerton, 2007). The structures of Lm are thin and sparse, sometimes described as scattered colonies or knitted chains (Rieu et al., 2008). Their matrix composition is also rather different and particularly rich in protein and extracellular DNA (Harmsen et al., 2010; Combrouse et al., 2013). *Listeria*'s interactions with various bacteria in mixed biofilms have been previously investigated (Jeong & Frank, 1994; Carpentier & Chassaing, 2004).

In real environments of food processing Lm is thought to be present in biofilms in commensal association with compatible partners (Elias & Banin, 2012) one of which seems to be *Pseudomonas*. As multispecies biofilms are more resistant to cleaning and disinfection agents than monospecies biofilms (Simoes et al., 2009) better knowledge of their structural features may help to develop more efficient eradication alternatives.

This chapter focuses on three issues: 1) Global outcome of the interactions between Lm and Pf on both biofilm and planktonic cell numbers. 2) Comparison of the results at 20 and 4°C, as low temperatures are very relevant in the food industry context. 3) Spatial distribution of the two species in biofilms, as seen by CLSM. One psychrotrophic Pf collection strain was used for these aims, together with six different *Listeria*s: the reference strain of Lm, Scott A, four persistent strains of the same species, repeatedly sampled in a meat product processing plant (Ortiz et al., 2010) and one strain of *L. innocua*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Pf ATCC 948TM, *Listeria innocua* ATCC 33090TM and five strains of *Lm*: 4 persistent strains, S1 (serotype 1/2a; lineage II), S2 (1/2a; lineage II), S4-1 (1/2b; lineage I), and S10-1 (1/2a; lineage II), isolated from an Iberian pig slaughterhouse and a processing plant by Ortiz et al. (2010) and *Lm* Scott A (4b; lineage I), were selected as former biofilm organisms. All the strains were stored at -20°C in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) with 15% glycerol. Preinocula were obtained after incubation for 24h under shaking (80 rpm) at 20°C in TSB and reaching up to mid-exponential phase. Cells were harvested by centrifugation at 4000 × g for 10 min, washed twice in sterile TSB and their OD₆₀₀ adjusted in order to reach 10⁴ CFU·mL⁻¹ of each bacteria after inoculation, whether in single or binary cultures.

Experimental System

Biofilms were developed on single-use 22 × 22 mm thin, borosilicate commercial microscope glass coverslips. As described in Orgaz et al. (2011), 16 coverslips were held vertically by marginal insertion into the narrow radial slits of a Teflon carousel platform (6.6

cm diameter). The platform and its lid were assembled by an axial metallic rod for handling and placed into a 600 mL beaker. The whole system, i.e. coverslips, carousel and the covered 600 mL beaker, were heat-sterilized as a unit, before aseptically introducing 60 mL of inoculated TSB. In the case of multispecies biofilms both bacteria were inoculated at the same initial level, and their corresponding monospecies biofilms were used as controls. Incubation was carried out at 20°C/96h or 4°C/20 days, in a rotating shaker at 80 rpm. Under these conditions, the biofilm growth occupied about 70% of the coverslip's surface.

Cell Recovery and Counting

For sampling biofilm cells, glass coverslips were withdrawn with tweezers and were carefully rinsed in sterile 0.9% NaCl to discard weakly attached cells. Then, attached cells were removed by swabbing both coverslip faces and then dispersed into tubes containing 1.5 mL peptone water. These were then vigorously stirred in a vortex to break up cell aggregates. Sampling of the planktonic phase was also carried out in parallel by withdrawing 100 µL of the culture medium at each time. Biofilms and planktonic cells were appropriately diluted in peptone water and the pertinent dilutions were plated according to the drop method described by Hoben & Somasegaran (1982). Briefly, 3 drops of 20µL were deposited into plates of selective media, PALCAM (Oxoid) and *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid) for counting *Listeria* spp. and *Pseudomonas* spp., respectively. Colonies were counted after 48 h incubation at 37°C or 30°C, for *Lm* or *Pf*, respectively.

Biomass Determination

To evaluate the attached biomass (cells plus matrix) two coverslips of each carousel were dried and stained for 2 min in a 1% Coomassie Blue solution in acetic acid/methanol/water (1:2.5:6.5). Once rinsed and dried again, coverslips were scanned in a Bio-Rad GS-690 densitometer, with Molecular Analyst software (Bio-Rad Inc.) for image analysis. The average optical density of the whole glass coupon surface was obtained, using a green filter corresponding to a 520–570 nm wavelength.

Apparent Attached-cell Generation Times

Apparent generation times of the attached counts over the exponential phase were calculated. *Apparent* means that a combination of the overall proliferation and the balance between attached and detached cells is integrated in each result of viable attached cells. *Apparent* generation times were calculated for monospecies biofilms of *Lm* Scott A and binary biofilms of *Lm* Scott A and *Pf* ATCC 948TM, at 20°C and 4°C, using the following equations:

$$\mu = (\log N_2 - \log N_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

$$g = \log 2 / \mu \quad (2)$$

being N_2 the attached cell density at the end of the exponential growth phase; N_1 the attached cell density at the beginning of the exponential growth phase; t_2 and t_1 were the length of time to attain N_2 and N_1 , respectively.

Statistical Analysis

Analysis of the association effect was performed on planktonic and biofilm counts of *Pf* and *Lm* both in mono and binary cultures. Data were analyzed using Statgraphics Plus 5.0 software (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md., USA) and ONE-way ANOVA analysis of variance. Mean comparisons were carried out to determine significant differences at a 95.0% confidence level ($p < 0.05$).

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

For CLSM observation, biofilms developed in glass coverslips were rinsed with sterile 0.9% NaCl and then stained with ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability kit (V7023, Invitrogen). This kit includes DAPI, which stains all the cells and Texas Red-X, which selectively binds surfaces of Gram-positive bacteria. Thus, the blue cells here correspond to *Pf*, whereas cells that exhibit red surfaces correspond to *Lm*. CLSM images from 0.12 x 0.12 mm coupon areas were obtained using a TCS SP2 microscope (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) with a water immersion objective lens 63X. Three-dimensional projections (Maximum Intensity Projection, MIP) and extended section views of biofilm structures were reconstructed from z-stacks using IMARIS® 7.6 software (Bitplane AG, Zürich, Switzerland). In order to analyze the spatial distribution of the *Lm* population within the binary species biofilms, a parameter here called biovolume was calculated using the MeasurementPro module of Imaris 7.6. For this, the whole image was first segmented and analyzed to obtain the total volume occupied by cells (that is, blue cells plus red cells); then the image was divided into two sections, the top layer corresponding to the upper 50% of the biovolume and the bottom layers to the inferior 50%. *Listeria* spatial distribution was thus calculated as a percentage of red in each of the above-mentioned sections.

RESULTS

Counts in Planktonic Phase and Biofilms from Monospecies and Dual-species Cultures

In the planktonic phase of the dual cultures with *Pf* and *Lm* strain Scott A, the net outcome of species interaction for *Lm*, in terms of viable cells, was practically neutral at both temperatures (Figure 1A and B). In other words, *Lm* growth was not affected by the presence of *Pf*. At some intermediate culture stages at 4°C, however, the interaction outcome was even negative for *Lm*. *Pf* cell counts, planktonic or in biofilms, were not affected by the presence of *Lm* (data not shown).

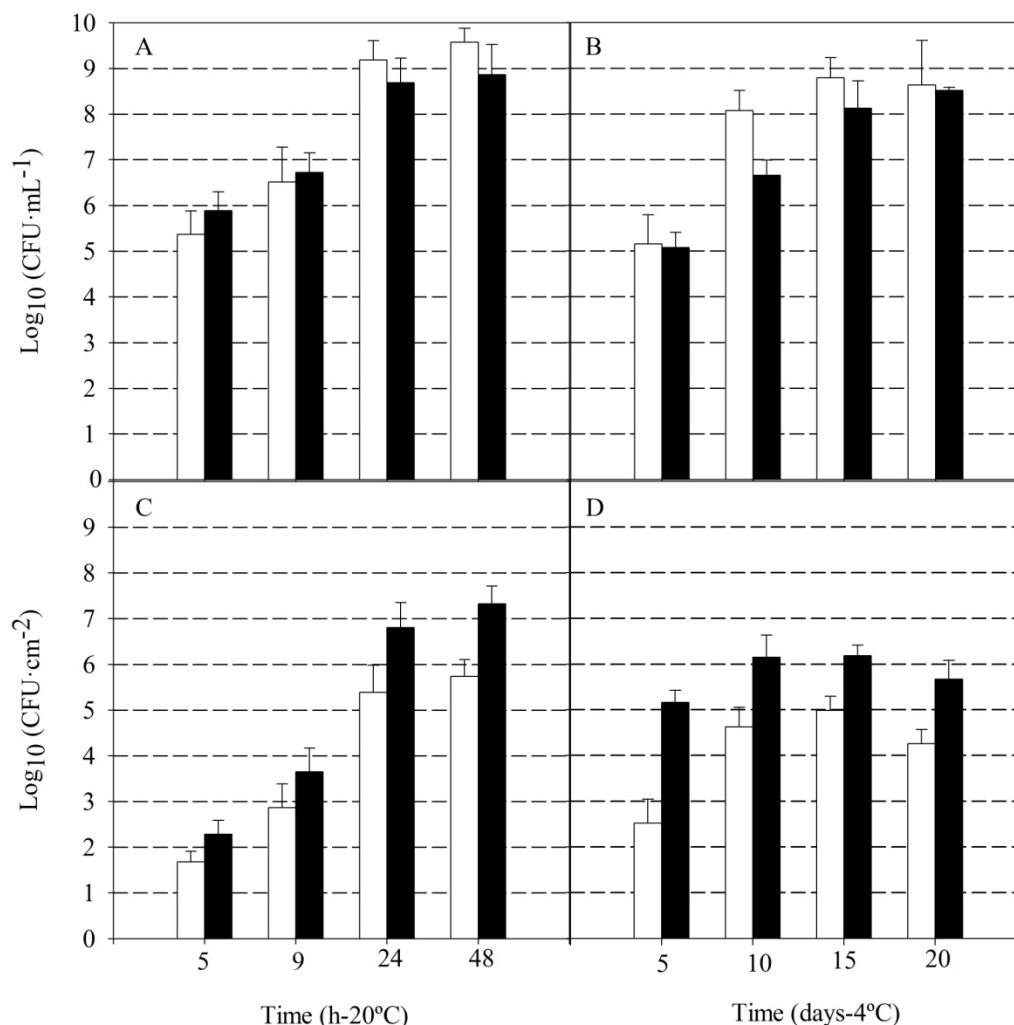


Figure 1. Counts of *Lm* Scott A in monospecies (white bars) or in dual cultures with *Pf* (black), incubated at 20°C (left) or 4°C (right). Planktonic cells above, biofilm cells below. Error bars represent the confidence interval for the mean (n = 4). Biofilm counts in mono- and multi-species cultures were all significantly different ($P < 0.01$).

At least with the inocula sizes used in these experiments (yielding 10^4 CFU ml⁻¹ of each species at the start of the culture) all the strains, tested here, of *Lm* produce monospecies biofilms. Therefore, no absolute dependence for *Pseudomonas* primary colonization was observed. However, in the dual cultures biofilm phase (Figure 1C and D) the combination of *Pf* and *Lm* Scott A was always beneficial for *Lm* (at least 1 log extra growth) and even more at 4°C. There were up to 200-fold more *Lm* cells per cm² in 5-day biofilms at 4°C with *Pseudomonas* than without. The apparent growth rate for *Lm* Scott A in biofilms, i.e. the figure combining attached cell multiplication rate and new cell attachment, was 0.05 h^{-1} at the monospecies and 0.09 h^{-1} at the dual-species biofilms at 4°C.

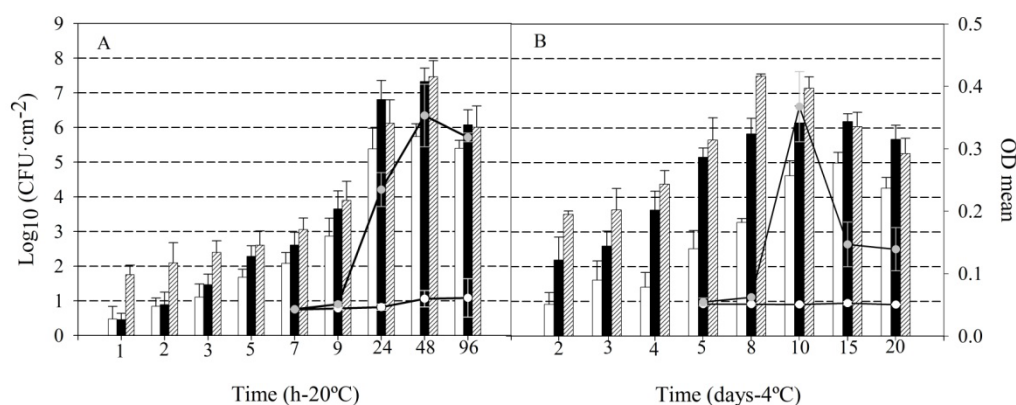


Figure 2. Counts of *Lm* Scott A in monospecies (white bars) or dual species (black) biofilms and *Pf* counts in the dual species biofilms (lined bars), along incubation time at 20°C (A) or 4°C (B). Lines represent biomass OD in pure (white circles) or dual-species cultures (gray circles). (n=5). Differences between *Lm* counts in pure and dual-species biofilms were all significantly different ($P < 0.02$), except for the cases of 1h, 2h and 3h at 20°C.

Figure 2 presents count levels of the two species in mixed biofilms, from the early stages. The proportion between them was quite large initially; one *Lm* for every 10 or more *Pf*, but figures of the two species became closer later on. It could also be noted that during the first 3h at 20°C, *Lm* adhered at the same pace with or without *Pf*. At 4°C, however, *Lm* attachment was helped by *Pf* from the early stages.

Overall biofilm biomass (cells plus matrix) had a significantly different development pattern, depending on temperature and the biofilm being mono- or dual species. Matrix development in pure *Lm* biofilms was very scarce from the point of view of optical density and was practically unchanged even when the cell density reached 10^7 CFU cm^{-2} . In mixed biofilms the matrix was poorly developed until it rather suddenly started to grow. This sharp start took place at 20°C when *Pf* reached 10^4 CFU cm^{-2} in biofilms, but appeared delayed to a density of 10^7 CFU cm^{-2} when at 4°C. Over time, the biomass quantitative profile also varied with temperature (Figure 2 A and B); at 4°C, a larger decrease of biomass in old cultures was observed.

CLSM Images of Biofilms with *Pf* and *Listeria*

In monocultures of *Lm* Scott A cells look more aggregated at 20°C than at 4°C (Figure 3), but in both cases, biofilms were sparse and thin ($3\mu\text{m}$ thick). In the zenital images of dual species with similar *Lm* cell density, known from selective media plate counting (Figure 3B and D), red cells (*Lm*) were less visible and apparently much fewer at 4°C than at 20°C. The hypothesis then was that a masking effect of *Pf* was hiding most of *Lm* cells underneath.

An effect of blanketing or layering, to confirm that hypothesis, could be observed in the images of Figure 4, showing profiles of dual species biofilms with *Pf* and *Lm* Scott A, obtained at different temperatures and times. A layering distribution with *Lm* underneath *Pf* was observed in all cases, except after 15 days at 4°C, where few *Pf* were visible. It must be remembered that images such as those in Figure 4 do not correspond to the same individual

biofilm through time, but to randomly taken zones of different coupons taken from the same culture at different times of incubation.

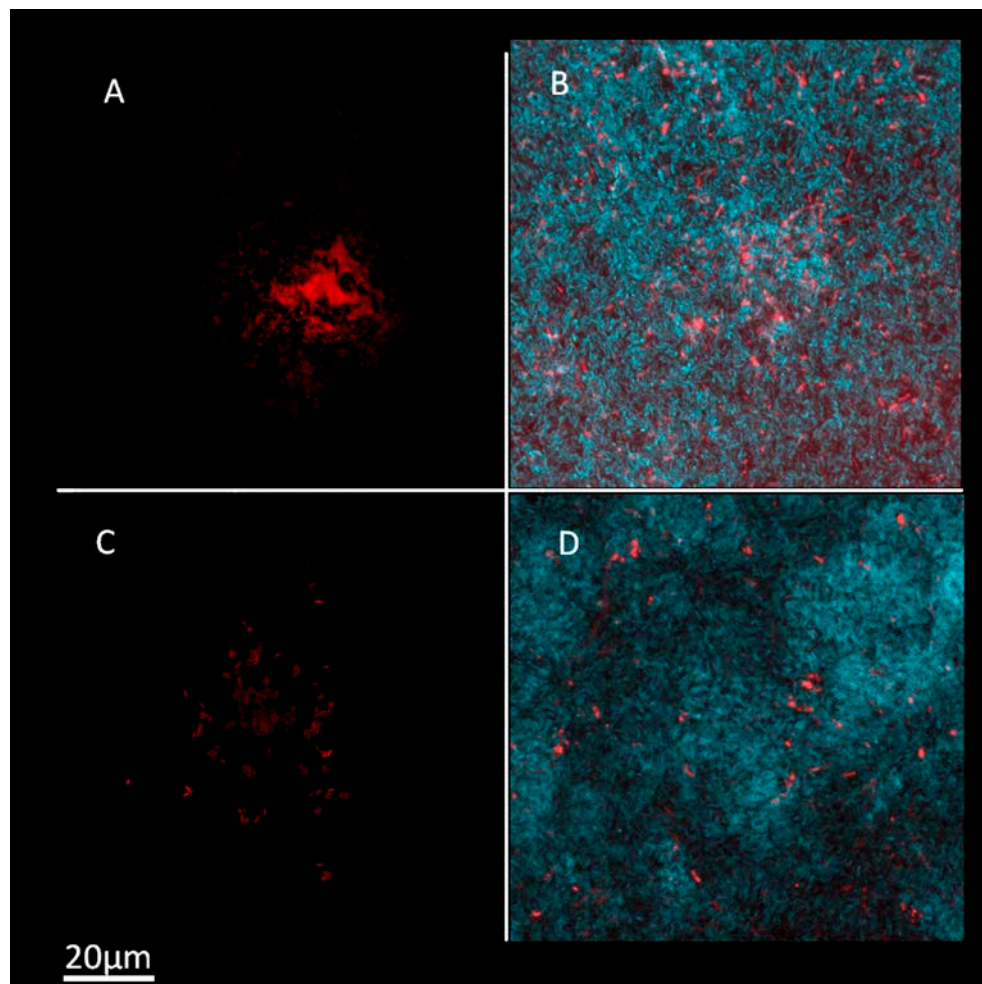


Figure 3. CLSM zenital images of biofilms such as those in Figure 1, with Lm Scott A in red and Pf in blue. A) Monospecies of Lm, after 24h at 20°C ($\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$: 2.4×10^5 ; thickness $\leq 3\mu\text{m}$). B) Dual species, 24h at 20°C ($\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$: 6.4×10^6 Lm and 1.3×10^6 Pf; thickness $20\mu\text{m}$). C) Monospecies of Lm, after 10 days at 4°C ($\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$: 9.7×10^4 ; thickness $\leq 3\mu\text{m}$). D) Dual species, 10 days at 4°C ($\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$: 1.5×10^6 Lm and 1.1×10^6 Pf; thickness $14\mu\text{m}$).

In order to confirm this pattern further, four Lm persistent strains obtained from a food industry facility were incubated with the same Pf for 10 days at 4°C. The resulting biofilm profiles are shown in Figure 5. Two types of structure could be there observed: a thin and compact one, with clear layering of the two species, shown by consortia containing Lm strains S1 and S10, and a spongy, fluffy and more complex profile, with less clear layering, in the case of biofilms with S2 and S4-1. Besides, whereas in most cases biofilm profiles show mixtures of single cells, in those of consortium Pf/Lm S2 the local accumulation of microcolonies of just one of the species was visible.

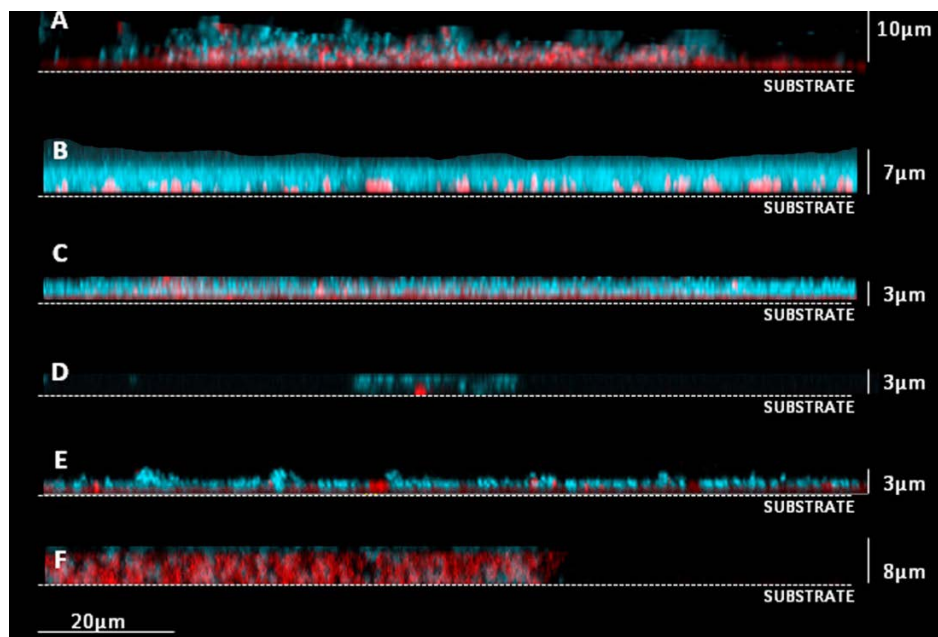


Figure 4. CLSM transversal images of dual species biofilms with Lm Scott A in red and Pf in blue. A) After 48h at 20°C (CFU·cm⁻²: 2.14 x 10⁷ Lm and 2.93 x 10⁷ Pf). B) 72h at 20°C (CFU·cm⁻²: 2.87 x 10⁷ Lm and 2.93 x 10⁸ Pf). C) 96h at 20°C (CFU·cm⁻²: 1.17 x 10⁶ Lm and 1.01 x 10⁶ Pf). D) 4 days at 4°C (CFU·cm⁻²: 4.27 x 10³ Lm and 2.41 x 10⁴ Pf). E) 8 days at 4°C (CFU·cm⁻²: 6.73 x 10⁵ Lm and 3.12 x 10⁷ Pf). F) 15 days at 4°C (CFU·cm⁻²: 1.53 x 10⁶ Lm and 1.10 x 10⁶ Pf).

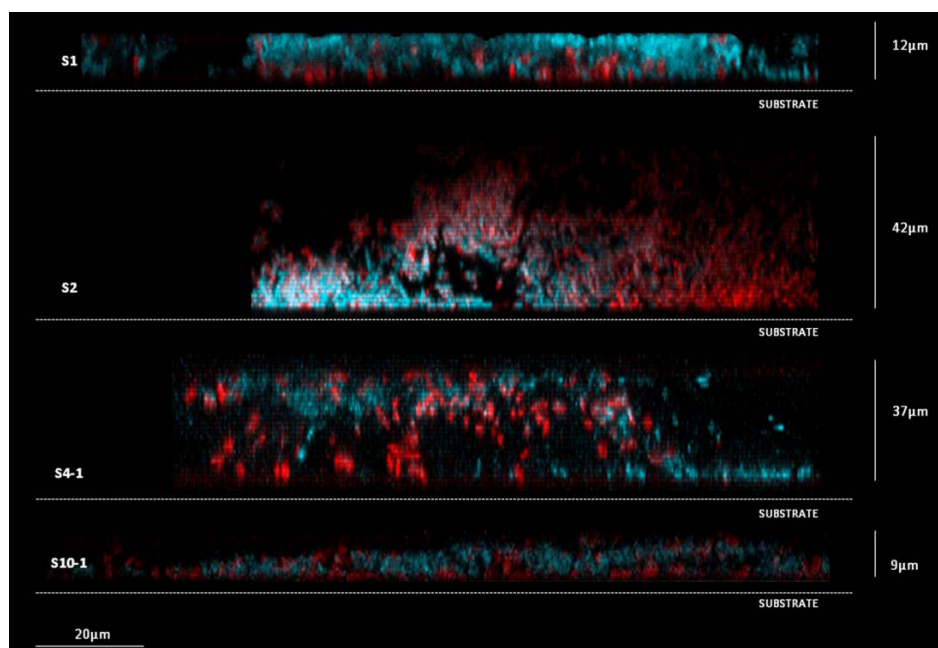


Figure 5. CLSM transversal images of dual species biofilms with four different persistent Lm strains in red, and Pf in blue, after 10 days at 4°C. S1) CFU·cm⁻²: 5.48 x 10⁵ Lm and 2.82 x 10⁷ Pf. S2) CFU·cm⁻²: 1.74 x 10⁵ Lm and 5.01 x 10⁷ Pf. S4-1) CFU·cm⁻²: 2.45 x 10⁵ Lm and 3.39 x 10⁷ Pf. S10-1) CFU·cm⁻²: 2.24 x 10⁵ Lm and 5.01 x 10⁷ Pf.

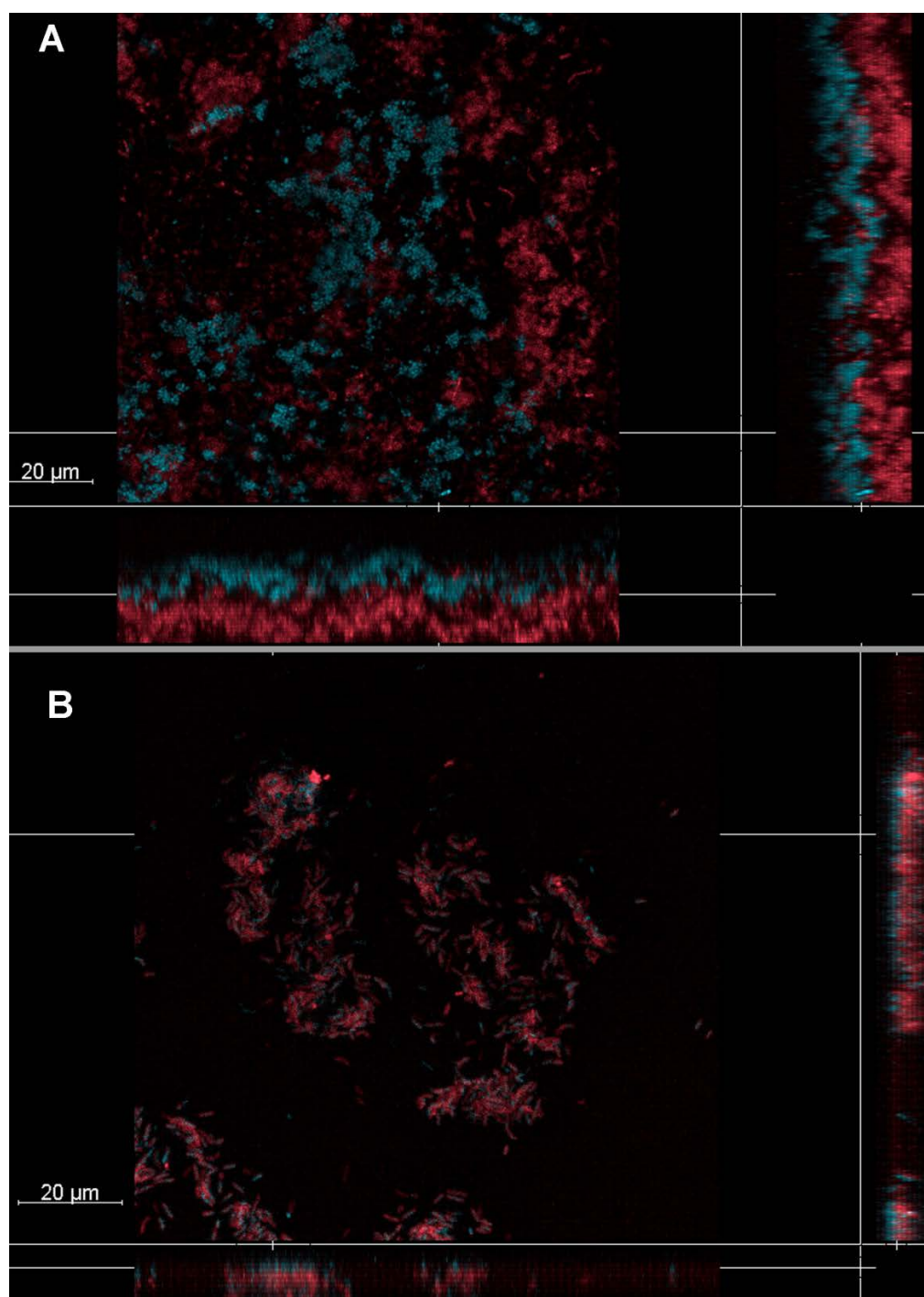


Figure 6. CLSM extended section view (z-y and z-x planes) of dual species biofilms with *Listeria innocua* ATCC® 33090™ in red and Pf in blue. A) after 96h at 20°C (CFU·cm⁻²: 1.27×10^8 *L. innocua* and 6.16×10^8 Pf; Thickness 28 µm). B) 20 days at 4°C (CFU·cm⁻²: 2.02×10^5 *L. innocua* and 4.86×10^7 Pf; Thickness 8 µm).

In consortia of Pf with *L. innocua* (Figure 6), species layering in the biofilms was similar to that observed for Lm, with a spongy but neat stratification after 96h at 20°C and a denser picture, apparently with less EPS, in the 20-day at 4°C case, probably corresponding to an old biofilm.

Listeria's percentage distributions between the top half and bottom half of the profile of each dual species biofilms of Pf with *Listeria* studied here are shown in Table 1. The figures represent the % of *Listeria* color label present in the top and bottom halves of the biofilm biovolume, the bottom being the substratum's surface. Of the twelve cases checked for quantifiable layering, nine presented more cells in the "deep compartment" or bottom layer of the biofilms, although in two of those cases only 54% of the total *Listeria* cells were there. The more clear-cut layered distribution could be observed at early and intermediate incubation times. *L. innocua* dual biofilms with Pf also presented layering in the images from cultures at 20°C. No relationship between serotype or lineage of Lm strains and their spatial distribution in dual biofilms was detected (Valderrama & Cutter, 2013).

Table 1. Layering of *Listeria* cells in the dual-species biofilms shown in figures 4 to 6

Species	Strain	Serotype (lineage)	T (°C)	Time	Distribution (%)	
					Top Layer	Bottom Layer
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	20	48h	19	81
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	20	72h	45	54
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	20	96h	22	78
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	4	4days	19	81
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	4	8days	11	89
<i>L m</i>	Scott A	4b (I)	4	15 days	45	54
<i>L m</i>	S1p	1/2a (II)	4	10 days	53	47
<i>L m</i>	S2p	1/2a (II)	4	10 days	34	66
<i>L m</i>	S4-1p	1/2b (I)	4	10 days	63	37
<i>L m</i>	S10p	1/2a (II)	4	10 days	40	60
<i>L. innocua</i>	ATCC® 33090™	-	20	96h	14	86
<i>L. innocua</i>	ATCC® 33090™	-	4	20 days	72	28

DISCUSSION

Outcome of the Interactions between Pf and Lm Scott A on the Planktonic and Biofilm Phases of Dual Cultures

In the conditions used, there was a striking contrast between the neutral relationship in the planktonic phase of the co-culture and the positive relationship (at least for Lm) in biofilms. This was more intense at low temperatures, where the specific cold adaptation

physiology of both species apparently meet or are introduced in a way that gives an advantage to Lm (Chan & Wiedmann, 2009).

Many interactions are likely to take place between these two species, their outcome depending on strains, environment, time and relative populations. In an attempt to find a specific Pf isolate to limit growth of Lm, Buchanan & Bagi (1999) worked with co-cultures of another (non-siderophore producing) Pf strain on Scott A Lm's planktonic growth kinetics. They concluded that all ecological outcome possibilities, that is, no effect, stimulation or inhibition of Lm, could be found with those co-cultures depending on environmental conditions and initial population levels. Buchanan achieved a remarkable reduction in Maximal Population Density of Lm (over 3-log) in spite of a decrease in generation time, as a result of the coculture at 4°C, pH 7 and 5% NaCl in BHI medium. Inhibition of Lm by *Pseudomonas* spp. had been related on other occasions to the production of siderophores or bacteriocins, factors that were checked out in Buchanan's work.

Other authors, however, have described the stimulation effects on planktonic growth of Lm by various species and strains of *Pseudomonas* (Farrag & Marth, 1989; Gram, 1993). One of the reasons frequently suggested to account for positive effects on Lm was *Pseudomonas* ability to produce extracellular proteinases that could mobilize essential amino acids, particularly in media such as milk. Extracellular enzymes such as proteinases, lipases and other hydrolases are very often produced by *Pseudomonas* (Sorhaug & Stepaniak, 1997) and at least some of them are particularly well expressed at low temperatures (Jaspe et al., 1995) and could contribute to nutrient commensalism.

Published antecedents on biofilm consortia involving Lm have reported the influence of strain precedence in contact with the substratum surface and the partners respective initial population; in general, reports on *Pseudomonas* stimulation tend to dominate those on inhibition of Lm attachment (Breen et al., 1982; Sasahara & Zottola, 1993; Carpentier & Chassaing, 2004; Hassan et al., 2004; Mellefont & Ross, 2007). Ecological interaction mechanisms involving cell-to-cell communication are likely to be more effective inside biofilms than in the planktonic environment (Elias & Banin, 2012) as the smaller distance between cells allows for higher concentrations of autoinducers, metabolic end-products that may act as precursors or inhibitors, enzymes, etc., playing a syntrophic role (Morris et al., 2013).

EPS and Layering in Dual Biofilms

The main and more frequently proposed factor for Pf cooperation with Lm in biofilms has always been EPS, large amounts of *Pseudomonas* EPS that would physically fix, embed and protect Lm. According to our results, however, dual Pf/Lm biofilms are not particularly thick and do not have much EPS. Some mutual benefit between Pf and Lm (nutrient or signal-based) may be holding or reinforcing their interaction at the expense of reduced EPS production. This appeared to be regulated by a QS switch mechanism, having a lower cell density threshold at 20° and at 4°C.

The most characteristic feature of these dual Pf/Lm biofilms was layering; a characteristic type of spatial distribution that may be a key to decipher the specific interactions between these two species when living in biofilms. Lm appeared to be located at the bottom layers of the dual biofilms, but at early stages Lm attached cells were fewer than those of Pf. There

were many more Pf than Lm cells to cover the substratum surface for quite a long time, particularly at 4°C, so Lm cells probably have to make their way towards the biofilm bottom across the Pf matrix. It may be that the extracellular chitinase activity, that Tirumalai & Prakash (2011) have described for Lm, helps their cells get through the entangled Pf's EPS network. Amino sugars, acetylated or not, have been described as components of Pf's extracellular polysaccharides (Kives et al., 2006). In our experience we found an exception to layering with *Listeria* (Lm and *L. innocua*) where at the bottom were old biofilms grown in batch; spontaneous or physiological shedding or detachment of superficial Pf cells located at upper layers could account for it (Kaplan, 2010; McDougald et al., 2012).

A bottom location in the biofilm structure is, so to say, not comfortable but safe. Survival in anaerobiosis (Lungu et al., 2009) and through starvation stress (Lungu et al., 2010) has been described for Lm. Depth and very slow doubling time would contribute to the highly increased resistance to antimicrobials observed for Lm in multispecies biofilms by different authors (Bourion & Cerf, 1996; Fatemi & Frank, 1999; Simoes et al., 2009; Lourenco et al., 2011; Ibusquiza et al., 2012).

Layering is a structural setup fit for cooperation (Elias & Banin, 2012) or syntrophy (Morris et al., 2013). When its outcome is negative for the covered partner, it is called blanketing (Rendueles & Ghigo, 2012). One such case involving Lm in coculture at 25°C has been described (Habimana et al., 2011); also in the bottom layers, Lm was overtaken by *Lactococcus lactis*. Further, Almeida et al. (2011) reported a clear case of layering in biofilms at 21°C involving Lm at the bottom layers together with *Salmonella enterica*, being covered by fast growing *Escherichia coli*.

Is *Pseudomonas* a Primary Surface Colonizer Needed for Lm Attachment?

Pseudomonas early colonization of surfaces is beneficial for Lm attachment but not indispensable. Diversity in Lm independent biofilm forming ability according to strain and environment has been previously reported (Borucki et al., 2003; Moretro & Langsrud, 2004; Moltz & Martin, 2005). Lm in TSB can form monospecies biofilms reaching rather high cellular densities, around 10^5 CFU cm⁻² at 20°C and slightly less at 4°C. When Pf was present however, Lm cells per cm² in biofilms increased about 1 log at 20°C and 2 log at 4°C; not needed, right, but very convenient.

The primary colonization concept may be complemented by the subsequent layered structure: the first surface colonizer (Pf) could be later colonized itself (its matrix) by a guest (Lm) that may work out a thorough restructuration of its initial shelter. Pf could be somehow compensated by Lm, possibly providing the host with some useful service, such as acting as a sink for a self-inhibitory end product that would otherwise be dumped outside.

Dual Biofilms at Low Temperatures

Pf/Lm co-culture appeared to be more beneficial for Lm at 4°C than at 20°C. Shortening of the lag phase, which is rather long for Lm at low temperatures (Chan & Wiedmann, 2009) seems to be one of the mechanisms; the other presumably being the migration to the bottom

layers, later on. This late advantage would disappear when Pf cells get detached, as the biofilm reaches a dispersion or detachment stage (McDougald et al., 2012).

In the food chain context, refrigeration of foods and equipment represent a selective niche for psychrotrophs such as Pf and Lm (Valderrama & Cutter, 2013). There is therefore a need to know the conditions or factors that allow or enhance Lm growth, survival or cell transfer in the cold. Biofilms favor all that, and the presence of *Pseudomonas* favors higher levels of Lm in biofilms. Elimination of *Pseudomonas* and layered Pf and Lm-carrying biofilms are therefore adequate targets to reduce Lm prevalence and improve food safety.

Other saprophytic, psychrotrophic and good biofilm former bacteria different from *Pseudomonas*, which could form layered biofilms the strain of Pf used here. And maybe not all Lm strains are fit to dive into the biofilm's bottom layers; they may stay in more accessible locations, to the advantage of the food plant hygienist. In summary, cleaning procedures aimed at detaching the top biofilm layers occupied by *Pseudomonas* or a similar host, or penetration through them, could be a good strategy for Lm eradication.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank J.V. Martinez-Suarez for kindly providing persistent *Listeria monocytogenes* strains, CLSM services of the University Complutense for their skillful assistance, and the Spanish Ministry of Economy and Competition for funding project AGL2010-22212-C02-01.

REFERENCES

- Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW, Vieira MJ. Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *Plos One*. 2011; 6(3).
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(12):7336-42.
- Bourion F, Cerf O. Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon(R) and rubber. *Sciences Des Aliments*. 1996; 16(2):151-66.
- Breen J, Barnes D, Ganguly R. Protective effect of *Pseudomonas* slime polysaccharide against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology*. 1982; 4(4):262-268.
- Buchanan RL, Bagi LK. Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 1999; 16(5):523-9.
- Carpentier B, Chassaing D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 97(2):111-22.
- Carpentier B, Cerf O. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 145(1):1-8.
- Chan YC, Wiedmann M. Physiology and Genetics of *Listeria monocytogenes* Survival and Growth at Cold Temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2009; 49(3):237-53.

- Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2003; 2:22-32.
- Combrouse T, Sadovskaya I, Faille C, Kol O, Guerardel Y, Midelet-Bourdin G. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 2013; 114(4):1120-31.
- Costerton, J.W. Toward a unified biofilm theory. In *The Biofilm Primer* (1st ed.); Heidelberg, CE, Ed.; Springer: Berlin, Germany. 2007.
- Da Silva EP, Pereira De Martinis EC. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97(3):957-68.
- Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *Fems Microbiology Reviews*. 2012; 36(5):990-1004.
- Farrag SA, Marth EH. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7-degrees-c or 13-degrees-c in skim milk. *Journal of Food Protection*. 1989; 52(12):852-5.
- Fatemi P, Frank JF. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*. 1999; 62(7):761-5.
- Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(9):623-33.
- Fratamico PM, Annous BA, Gunther IV NW. *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC Press, Woodhead Pub: Boca Raton, Oxford. 2009.
- Gram L. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; 59(7):2197-203.
- Habimana O, Guillier L, Kulakauskas S, Briandet R. Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling*. 2011; 27(9):1065-72.
- Harmsen M, Lappann M, Knochel S, Molin S. Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76(7):2271-9.
- Hassan AN, Birt DM, Frank JF. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *J Food Prot*. 2004; 67(2):322-7.
- Hoben HJ, Somasegaran P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp in inoculants made from pre-sterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982; 44(5):1246-7
- Huis in 't Veld JH. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of food microbiology*. 1996; 33(1):1-18.
- Ibusquiza PS, Herrera JR, Vazquez-Sanchez D, Cabo ML. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control*. 2012; 25(1):202-10.
- Jaspe A, Oviedo P, Fernandez L, Palacios P, Sanjose C. Cooling raw-milk - change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. *Journal of Food Protection*. 1995; 58(8):915-21.
- Jeong DK, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10-degrees-c in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*. 1994; 57(7):576-86.

- Kaplan JB. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*. 2010;89 (3):205-18.
- Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs CA. "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90(6):1869-81.
- Kives J, Orgaz B, SanJose C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2006; 52(2):123-7.
- Kjelleberg S, Givskov M. *The Biofilm mode of life. Mechanisms and adaptations*. Horizon Bioscience: Norfolk, UK. 2007
- Liao CH, (2006). *Pseudomonas* related genera. In *Food Spoilage Microorganisms*. Blackburn CV, Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL. 2006: 507-540.
- Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(7).
- Lourenco A, Machado H, Brito L. Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 degrees C either in Pure Culture or in Co-Culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed Reduced Susceptibility to Sanitizers. *Journal of Food Science*. 2011; 76(2):M143-M8.
- Lungu B, Ricke SC, Johnson MG. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*. 2009; 15(1-2):7-17.
- Lungu B, Saldivar JC, Story R, Ricke SC, Johnson MG. The Combination of Energy-Dependent Internal Adaptation Mechanisms and External Factors Enables *Listeria monocytogenes* to Express a Strong Starvation Survival Response During Multiple-Nutrient Starvation. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010; 7(5):499-505.
- Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *Fems Microbiology Reviews*. 2012; 36(4):893-916.
- Mariani C, Oulahal N, Chamba JF, Dubois-Brissonnet F, Notz E, Briandet R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*. 2011; 22(8):1357-62.
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*. 2012; 10(1):39-50.
- Mellefont LA, Ross T. Effect of potassium lactate and a potassium lactate-sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaged sliced ham. *Journal of Food Protection*. 2007; 70(10):2297-305.
- Mettler E, Carpentier B. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection*. 1998; 61(1):57-65.
- Moltz AG, Martin SE. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 2005; 68(1):92-7.
- Moretro T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. 2004; 1:107-121.
- Morris BEL, Henneberger R, Huber H, Moissl-Eichinger C. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *Fems Microbiology Reviews*. 2013; 37(3):384-406.
- Nilsson L, Gram L, Huss HH. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*. 1999; 62(4):336-42.

- Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 150(1):14-24.
- Orgaz B, Lobete MM, Puga CH, SanJose C. Effectiveness of Chitosan against Mature Biofilms Formed by Food Related Bacteria. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(1):817-28.
- Ortiz S, Lopez V, Villatoro D, Lopez P, Davila JC, Martinez-Suarez JV. A 3-Year Surveillance of the Genetic Diversity and Persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian Pig Slaughterhouse and Processing Plant. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010; 7(10):1177-84.
- Rendueles O, Ghigo J-M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *Fems Microbiology Reviews*. 2012; 36(5):972-89.
- Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmyn D, Guzzo J, Piveteau P. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(14):4491-7.
- Ryser ET, Marth EH. *Listeria, listeriosis and food safety* (3rd ed.). CRC Press: Boca Raton, FL. 2007.
- Sasahara KC, Zottola EA. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*. 1993; 56(12):1022-8.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *Fems Microbiology Reviews*. 2011; 35(4):652-80.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*. 2009; 43(1):229-37.
- Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 1997; 8(2):35-41.
- Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013; 31(2):572-85.
- Tirumalai PS, Prakash S. Expression of chitinase and chitin binding proteins (CBP's) by *Listeria monocytogenes* J0161 in biofilm and Co-culture broths. *African Journal of Microbiology Research*. 2011; 5(29):5188-93.
- Valderrama WB, Cutter CN. An Ecological Perspective of *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013; 53(8):801-17.
- Verran J, Airey P, Packer A, Whitehead KA. Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. In *Advances in Applied Microbiology*. Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, Eds.; 2008; 64:223-46.

CAPÍTULO II

*Listeria monocytogenes redesign of Pseudomonas fluorescens
biofilms. Structural layouts at different development stages at 4 and 20°C*

Frontiers in Microbiology. Section Food Microbiology (En revisión 2015)

***Listeria monocytogenes* redesign of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Structural layouts at different development stages at 4 and 20°C.**

Puga CH¹, Orgaz B^{1*}, SanJose C¹

Nutrition, Food Science and Technology Department
Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid (Spain)

¹Department of Nutrition, Food Science and Technology, Faculty of Veterinary,
Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

1 Abstract

Changes in spatial organization, as observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM), viable cell content, biovolume and substratum surface coverage of the biofilms formed on glass by *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) resulting from co-culture with *Listeria monocytogenes* (*Lm*), were examined. Two strains of *Lm*, two culture temperatures and two biofilm developmental stages were checked. Both *Lm* strains, a persistently sampled isolate from a meat factory and Scott A, induced shrinkage in biovolume, both at 20°C and 4°C, in mature or old biofilms, without loss of *Pf* cell count per surface unit in many cases. The nearly homogeneous pattern of surface coverage shown by mono-species *Pf* biofilms, turned into more irregular layouts in co-culture with *Lm*. Spatial distribution of the matrix and cell fractions, in both mono and dual-species biofilms, changed along time towards a predominantly matrix upper layer with few cells at 20°C; that was not the case at 4°C. Between 15 and 56 % of the substratum area was covered by biofilm in the chosen conditions, the extent depending on temperature, time and *Lm* strain. At early development stages, *Lm* had a neutral or positive effect on that percentage when at 20°C, but a negative one at 4°C. Heterogeneity in distribution and accessibility of cell and matrix materials might be a relevant aspect in order to clean or control *Lm*-carrying biofilms in the food sector.

Key words

Listeria monocytogenes, *Pseudomonas*, biofilms, mixed, spatial distribution, refrigeration

2 Introduction

Known previously as an animal pathogen and ubiquitous in nature, its emergence as a foodborne human pathogen in the 80's (Ryser and Marth, 2007; Warriner and Namvar, 2009) has been attributed to an unprecedented global improvement of hygienic practices in food industry from the 1970's, including both better cleaning and disinfection (C&D) methods and widespread use of refrigeration. This public health progress, reducing the prevalence of most foodborne diseases, had an undesirable side effect. Elimination or low- temperature constrain of microbial competitors implied a new chance for *Listeria*, one of the few psychrotrophic bacterial pathogens, to thrive in refrigerated foods. Low temperature storage and handling of raw materials, pasteurized or Ready To Eat (RTE) foods, also means the selection of psychrotrophic spoilage bacteria such as *Pseudomonas* species (*fluorescens*, *putida*, *fragi*) able to cause important quality defects in protein-rich foods (Andreani et al., 2015).

Coinciding with this trend and the development of microbial ecology approaches to food safety and quality, there has been an increasing interest in biofilms (BF) (Costerton et al., 1995; Srey et al., 2013). As *Pseudomonas* species are well known as quick and thick BF producers, knowledge on the BF formed by its non-pathogenic species, often dominant in food spoilage, has been driven by the far more abundant clinical and basic information on *P. aeruginosa*'s BF (Silby et al., 2011; Mann, 2012). Many authors also have studied *Listeria monocytogenes*'s (*Lm*) carrying BF (Moretro et al., 2004; Rieu et al., 2008; Bonsaglia et al., 2014; Guilbaud et al., 2015).

Interactions between *Pseudomonas* and *Lm* in BF were initially described by Sasahara and Zottola (1993). Their claim on the need of a primary surface colonizer, such as *Pseudomonas* (in that case *P. fragi*) for *Lm* attachment, was a very relevant one and not just for the food microbiology field. Multispecies BF have attracted attention mostly because their partners can resist harder antimicrobial challenges than single species BF (Burmolle et al., 2006; Simões et al., 2009; Sanchez-Vizueté et al., 2015) and because they are now acknowledged to be the natural form of BF. Various models are used to check the specific properties of mixed BF and to characterize the interactions between the partners and towards newcomers (Carpentier and Chassaing 2004; Moons et al., 2009; Yang et al., 2011; Elias and Banin, 2012; Burmolle et al., 2014; Giaouris et al., 2014; Jahid and Ha, 2014; Bridier et al., 2015; Giaouris, 2015) and many attempts are made to identify the natural BF cohabitants at critical sites, including specific food related facilities (Fox et al., 2014; Rodriguez et al., 2015; Roder et al., 2015).

New insights on the regulation of BF formation are helping to comprehend the particular BF to be found in food industry, where multiple strategies to prevent microbial growth are commonly combined to preserve foods (low temperature, low pH, high osmotic pressure, modified atmospheres, presence of natural antimicrobials, etc.). Those adverse situations may however imply just stress conditions for a small selection of the present microorganisms. Certain *Pseudomonas* and *Lm* strains belong to those selected few at low temperatures (Moretro and Langsrud, 2004; Hemery et al., 2007; Chan and

Wiedmann, 2009; Mann and Wozniak, 2012; Silby et al., 2011; Valderrama and Cutter, 2013) and they may jointly form BF on raw materials, foods and inert surfaces at food handling facilities. Though refrigeration tends to be used in food processing and food service facilities during operating hours, higher environmental temperatures tend to occur during pauses or implementation of C&D tasks. BF life may thus switch from 4 to 20°C, or even larger intervals at those sites. *Lm* strains that have been found to persist for months or even years (Carpentier and Cerf, 2011; Ortiz et al., 2010) are likely to have experienced changing culture conditions, apart from partial elimination and repeated sanitizer exposure by daily not fully effective C&D cycles. Better BF target information is needed to attain effective, cheap and sustainable results in the development of new *Lm* eradication methods.

This study tries, still in the track of Sasahara and Zottola, to follow the building up of *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) and *Lm* mixed BF in temperature conditions that are realistic for food industry. Environmental strains of both species were used, adding well known *Lm* Scott A for comparison. Viability counting was combined with culture-independent evaluations, to get a hint of the heterogeneity in BF setups that could to be met by the hygienist. Previous evidence of spatial distribution in these dual-species BF has been already reported by the same authors (Puga et al., 2014).

3 Materials and Methods

3.1 Bacterial strains

Pseudomonas fluorescens ATCC 948TM (*Pf*) and two strains of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) were selected as BF former organisms. S1 is a *Lm* persistent strain, (serotype 1/2a; lineage II) isolated by Ortiz et al. (2010) from an Iberian pig slaughterhouse and its associated processing plant; the other *Lm* was reference strain Scott A (4b; lineage I). All of them were stored at -20 °C in Tryptone Soya Broth (TSB, OXOID) with 15% glycerol. Preinocula were obtained in TSB after 24h incubation at 20°C while shaking (80 rpm) to reach mid exponential phase. Cells were harvested by centrifugation at 4000 × g for 10 min, washed twice in sterile TSB and their OD₆₀₀ adjusted, in order to reach 10⁴ CFU·mL⁻¹ of each bacteria at the start of either single or binary cultures.

3.2 Experimental system

BF developed on single-use 22 × 22 mm thin, borosilicate commercial microscope glass coverslips. As described in Orgaz et al. (2011), 16 coverslips were held vertically by marginal insertion into the narrow radial slits of a Teflon carousel platform (6.6 cm diameter). The platform and its lid were assembled by an axial metallic rod for handling and placed into a 600 mL beaker. The whole system, *i.e.* coverslips, carousel and the covered 600 mL beaker, were heat-sterilized as a unit, before aseptically introducing 60 mL of inoculated TSB. For multispecies BF containing *Pf* and one of the two *Lm* strains afore mentioned, both bacteria were inoculated at the same level (1:1). *Pf* mono-species

BF were used as controls. Incubation was carried out at 20°C or 4°C, in a rotating shaker at 80 rpm. Under these conditions, BF growth occupied almost 70% of the coverslip's surface. Samples corresponding to "mature BF" were taken after 48h at 20°C, or 10 days at 4°C. Those taken at 20°C/144h or 4°C/20days were here called "old BF".

3.3 Cell recovery and counting

For sampling BF cells, glass coverslips were withdrawn with tweezers, were carefully rinsed in sterile 0.9% NaCl to discard weakly attached cells. Then, attached cells were removed by swabbing both coverslip faces and dispersed into tubes containing 1.5 mL peptone water. These were then vigorously stirred in a vortex to break up cell aggregates. BF cells were appropriately diluted in the pertinent dilutions of peptone water to be plated according to the drop method described by Hoben & Somasegaran (1982). Briefly, 3 drops of 20µL were deposited into plates of selective media, PALCAM (OXOID) and *Pseudomonas* Agar Base (PAB, OXOID) for counting *Listeria* spp. and *Pseudomonas* spp., respectively in mono and dual-species BF. Colonies were counted after 48h incubation, at 37 °C or 30 °C, for *Lm* or *Pf* respectively.

3.4 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

The effect of *Lm* on *Pf* in dual-species BF structure was assessed by CLSM. For observation, BF developed in glass coverslips were rinsed with sterile 0.9% NaCl and stained with Syto 13 (S7575, Life Technologies) which generally labels all bacteria in a population, and Calcofluor White (18909, FLUKA) a non-specific fluorochrome that binds to cellulose and other polysaccharides present in the EPS BF matrix. Thus, for quantification, here green corresponds to cells, whereas blue corresponds to EPS. Representative regions located at the Air-Liquid-Interphase (ALI) zone (unless mentioned otherwise) were selected from each coupon. CLSM images of these locations (0.12 x 0.12 mm) were obtained using a FLUOVIEW® FV 1200 Laser Scanning Confocal Microscope (OLYMPUS) with an oil immersion objective lens 60X. Three-dimensional projections (Maximun Intensity Projection, MIP) were reconstructed from z-stacks using IMARIS® 8.1 software (BITPLANE AG, Zurich, Switzerland). The parameter here called *biovolume* was calculated using the MeasurementPro module of the above mentioned software; the whole image was thus segmented into two channels, green and blue, to estimate the volume occupied by cells or EPS. The total biovolume (µm³) was calculated as the sum of cells and EPS biovolumes, using five fields. Biovolume reduction was expressed taking the biovolume of the *Pf* mono-species BF as 100%. The Matrix/Cell ratio was calculated for every image.

3.5 Biomass determination

To evaluate the surface coverage of the attached biomass (cells plus EPS matrix) five coverslips of each type of BF were dried and stained for 2 min in a 1 ‰ Coomassie Blue (Brilliant Blue R, SIGMA) solution in acetic acid/methanol/water (1:2.5:6.5) mixture. The staining was repeated twice. Once rinsed and dried again, the coverslips were

scanned and analyzed using ImageJ (<http://imagej.net>). A parameter called **% of covered area** was estimated for every image. For this, the scanned images were first transformed into a binary system (*i.e.* black and white) and the surface occupied by black was quantified. The zone distribution of the biomass on the coupon was also appraised in each image. For this purpose, the coupon's area was divided into three equal rectangles: Air Phase (AP), Air-Liquid Interphase (ALI) and Fully Immersed phase (FI) and the biomass coverage of each area was measured. For calculations, the occupation in the AP was discarded, as that area was scarcely covered, assuming the total biomass coverage included just the ALI and FI zones (Figure 4).

4 Results

4.1 Effects of *L. monocytogenes* co-culture on *P. fluorescens*'s biofilms at 20°C

What are here called “mature” or fully grown BF (in these batch conditions, 48h at 20°C) are close to the end of the exponential phase of growth and hold around 4×10^7 CFU of *Pf*/cm² (Fig. 1, Table 1). At that stage, viable *Pf* cell numbers showed almost no change when co-cultured with an *Lm* strain. *Lm* grew at a much minor pace than *Pf* in the binary BF at 20°C, particularly Scott A, which lagged 4 logs behind. CLSM images, which in this study did not discriminate *Pf* and *Lm* cells (Fig. 2) presented a rather homogeneous surface coverage in the case of single species *Pf* BF and patchy, heterogeneous patterns for the binary BF, in spite of the low *Lm* numbers. When cell and matrix biovolumes were measured in a sample of coupon microcolonies (Table 2) co-culture resulted in a moderate decrease in BF biovolume, maximal thickness and surface coverage (Table 3). Considering that *Pf* viable cell number did not decrease, the outcome was a rise in microcolony density or compactness. The matrix to cell ratio (Table 3) 0.7 in the single species *Pf* BF, was not changed by the presence of the food industry-persistent S1 strain of *Lm*, but went down to 0.2 by the company of *Lm* Scott A. This strain caused a 75-80% matrix loss in binary BF (Table 2). On the other hand, the matrix tended to occupy a relatively more superficial position in the structure of both binary BF (Fig. 2) than that observed in mono-species *Pf* BF.

“Old” BF here (144h at 20°C) were at stationary phase. Dispersal had caused a 2-log loss of viable *Pf* cells at that stage, though *Lm*'s presence provided some protection against that loss (Fig. 1, Table 1). S1 *Lm* counts had matched those of *Pf* then, in contrast with Scott A, which was left 2 log behind. Maximal BF thickness (Table 2) in both mono and dual-species BF had decreased by approximately 50%. What was more striking was the change in accessibility of the matrix, cell-bared at the surface of the old BF (Fig. 2). Remaining cells were thus underneath, packed in a deeper, more sheltered position, in both the mono and dual-species old BF.

4.2 Effects of *L. monocytogenes* co-culture on *P. fluorescens*'s biofilms at 4°C

BF grown at 4°C for 10 days were also approaching the end of the exponential phase. Mono-species *Pf* BF had about one log lower viable *Pf* counts/cm² than those of a similar stage obtained at 20°C (Fig. 1, Table 1) and presented about half their maximal thickness (Table 2). In these mature binary BF, *Lm* viable counts were still 1-2 log behind *Pf*, whose numbers remained as in mono-species BF. Global biovolume reduction due to co-culture, however, was more intense than at 20°C (Table 2). Whereas in the mono-species BF the matrix mostly layered on top of cells, in the binary BF there was a considerable amount of material scattered on void substratum spaces, away from cells (Fig. 2).

Stationary phase mono-species BF (20 days at 4°C) had lost proportionally few *Pf* viable cells (Fig. 1, Table 1) or had perhaps restarted growth, beyond the dispersal stage. In these old binary BF, *Lm* and *Pf* viable counts had gone close. Global biovolume reduction strongly depended on *Lm* strain. It was the food industry- persistent strain S1 that caused more shrinkage of binary BF: a 96% loss in biovolume, over 50% loss in maximal BF thickness and a sharp fall, from 0.6 to 0.1, in matrix to cell ratio (Table 2, Fig. 2).

4.3 Aeration vs. mono and dual-species *P. fluorescens*'s biofilms development

Every experimental system to develop BF has its own particularities. The glass coupons (22 x 22 mm) used in this study as substratum surfaces, are held vertical on a platform immersed in the liquid culture medium, which covers only two thirds of the coupon area. To check whether the covered area was homogeneous in terms of BF colonization, the coupon was arbitrarily divided into three equal horizontal bands. The top one is not covered by liquid. The intermediate one, called ALI as it contacts the Air-Liquid Interphase and the area just below, is covered, intensely aerated and exposed to liquid shear during rotation shaken culture. The Fully Immersed (FI) one, less aerated zone, is at the bottom. It is assumed that aerobic bacteria such as *Pf* or *Lm* will develop BF quickly on the intermediate band and more slowly on the fully immersed band. As it is shown for whole coupon *Pf* mono-species BF in Fig. 3, at any given culture moment, important zonal differences in BF colonization do happen. In the regular procedure for viable cell counting, this is compensated, as the BF on two opposite entire faces of the coupon (6.4 cm²) are scrapped and mixed for plating and the results of four coupons from each experiment are averaged.

For CLSM analysis, however, a limited number of small fields (here 120 x 120 µm) are selected *de visu*, trying to show representative situations. To compare BF colonization in the two covered zones described above, biovolumes stained by calcofluor (matrix) and Syto 13 (all cells) were added for biomass quantification. As shown in Table 3, in both 20 and 4°C BF, the more aerated ALI zone was colonized first and the FI zone later; *Lm* presence did not significantly affect this overall progression. The overall covered area increased in this time interval, reaching maxima of 80-90%. Though real-size images of coupons with *Pf* mono-species BF in Fig. 3 show a disrupted continuum in biomass

distribution according to depth in the culture liquid, the discontinuity probably due to the particular fluid mechanics of the shaken cultures. With all, oxygen availability determined a different pace of surface colonization at the different coupon areas. This may imply local BF heterogeneities in terms of developmental stage.

5 Discussion

The outcome of species interaction usually depends on culture conditions, strains involved, not just species, order of arrival to the surface (Carpentier and Chassaing, 2004) and respective population sizes (Mellerfont et al., 2009). In this study, *Lm* numbers were initially as large as those of *Pf*. This proportion is unrealistic for food industry as a whole, where *Pseudomonas* spp. are far more prevalent. However, high local concentrations of *Lm* may occur at particular harborage sites, considering mentioned tendency to hide at the bottom of BF (Puga et al., 2014) and a good desiccation survival ability (Alavi et al., 2013). In this study, the relationship between the two species in the BF changed along time. While at the end of the exponential phase *Pf* still lead in viable counts, at stationary phase both species had reached similar cell densities, ensuring rather high levels of entrenched viable *Lm* (10^4 - 10^5 CFU/cm²).

The interaction did not only serve to boost attached *Lm* numbers; it also promoted a denser, more compact BF structure. It was not just *Lm* being passively engulfed by *Pf*'s BF development. Even at very low proportional numbers and probably through quorum sensing (QS), *Lm* provoked changes in matrix density that are likely to hinder diffusion. A denser matrix would contribute to the mechanisms that make mixed BF more resistant than mono-species ones against external attack by enzymes, antimicrobials or other agents (Burmolle et al., 2014; Sanchez-Vizueté et al., 2015). The shrinkage of the matrix could be possibly due to the production of an additional extracellular matrix component, such as amyloid fibers (Larsen et al., 2007; Dueholm et al., 2010; Zhou et al., 2012) or to other forms of alteration of the original *Pf* matrix framework (Lee et al., 2014; Steinberg and Kolodkin-Gal, 2015). In a previous study on binary *Pf/Lm* BF, using several *Lm* strains and specific species labelling, stratified species distribution was observed (Puga et al., 2014) with *Lm* occupying the deeper, more anaerobic BF layers, in spite of their apparently later incorporation to the BF, suggesting an special ability to get across the matrix.

CLSM images of the old BF formed at 20°C showed that dispersal had completely cleared out cells from the surfaces of the BF. Practically only the matrix was accessible. Remaining viable cells (nearly 10^6 *Pf* CFU/cm² and presumably a similar number of *Lm*) were well sheltered underneath. This backs the notion that age adds resistance of BF against stress in general (Lee et al., 2014; Serra et al., 2014) and on the other hand, suggests that enzymatic or otherwise matrix-eroding procedures may be a prerequisite to have access to *Lm* cells in stationary-phase BF.

BF development at 4°C was not just slower than at 20°C. The structural contraction or shrinkage observed as a result of co-culture, was intensified by low temperature and culture time. Maximal thickness did not decreased accordingly, as if “cold” BF and particularly binary ones, were more irregular in structure, thickness and matrix distribution than “warm” ones. Both *Pf* and *Lm* are known to express at low temperatures a wide range of different membrane components and enzymatic activities (Regeard et al., 2000; Hemery et al., 2007; Chan and Wiedmann, 2009; Durack et al., 2013) that could lead to different BF.

The ecological relationship between *Pf* and *Lm* in BF seemed to benefit *Lm* and be neutral for *Pf*, in terms of viable cell number and while in aerated cultured in a rich medium such as TSB. However, when subjected to different types of stress, such as low temperature or nutrient exhaustion, the compacted binary BF structure apparently switched the interaction to one of mutual benefit (Serra et al., 2014). If an abundant extracellular matrix such as that produced by *Pf* is usually considered as public goods, a reinforced, more compact matrix induced if not produced by *Lm* in the binary BF, could perhaps be considered as *Lm*’s contribution to enhanced public goods, providing more protection in spite of less growth, to both partners. As already mentioned for the overall outcome of interactions in mixed BF, the two *Lm* strains did not affect matrix modification in the same way; Scott A induced more matrix loss or shrinkage at 20°C, whereas S1 provoked an even more important loss or contraction at 4°C.

Zonal BF heterogeneity dependent on aeration and liquid shear, in the coupons used as experimental system, would certainly be a limitation to study a particular developmental stage. Physiological heterogeneity however is inherent to complex natural communities (Stewart and Franklin, 2008). In food industry, air-liquid interphases in particular are customary surface sites to find residual BF. To understand these results, it should be reminded that coupon viable cell figures are integral measurements, combining heterogeneous situations; more or less aerated zones grow at different speed and may be in a different mode. CLSM images, however, correspond to singular spot events. Besides, viable cells here are just those of *Pf* (determined in selective medium) whereas cell biovolume stained with Syto 13 includes all cells, both *Pf* and *Lm*, viable or not. The two parameters supply complementary information. Altogether, it could be claimed that semi-immersed coupons are a suitable experimental system to simulate actual food industry BF, as it integrates what happens at well-aerated zones, very prevalent in this context.

In conclusion, in this consortium, species interaction, cold stress and aging do contribute to a more compact BF structure than the one produced by a single species at 20°C. The actual change in the matrix framework and the way this is brought about, deserves further work, as the pathogen’s shelter is thus reinforced. On the other hand, the described BF variations including different patterns of surface coverage, thickness, cell accessibility and matrix distribution provide a challenging though very limited inventory of possible *Pf/Lm* BF targets to be met by C&D procedures.

6 Acknowledgments

The authors thank Dr. J.V. Martínez-Suárez for *Lm* strain S1, the Cytometry and Fluorescence Microscopy Center of the University Complutense of Madrid and Laura Muñoz for their skillful assistance and the Spanish Ministry of Economy and Competition for funding project AGL2010-22212-C02-01.

7 Tables and figures

Table 1. *P. fluorescens* (*Pf*) and *L. monocytogenes* (*Lm*) viable cells in the biofilms referred in Fig. 1. Different superscript in columns mean statistical differences.

Sample*	P	P1		PSc	
	(Log ₁₀ CFU·cm ⁻²)	(Log ₁₀ CFU·cm ⁻²)		(Log ₁₀ CFU·cm ⁻²)	
	<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	<i>Lm</i>	<i>Pf</i>	<i>Lm</i>
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
20°C/mature	7.6 ± 0.1 ^a	7.7 ± 0.07 ^a	5.9 ± 0.6 ^a	7.5 ± 0.31 ^a	6.7 ± 0.3 ^a
20°C/old	5.7 ± 0.1 ^c	6.2 ± 0.09 ^b	4.4 ± 0.2 ^b	6.3 ± 0.01 ^b	5.4 ± 0.1 ^b
4°C/mature	6.6 ± 0.8 ^{b,c}	6.7 ± 0.13 ^b	3.1 ± 0.1 ^c	6.4 ± 0.03 ^b	4.4 ± 0.2 ^c
4°C/old	6.2 ± 0.1 ^c	5.8 ± 0.66 ^b	5.6 ± 0.2 ^a	5.0 ± 0.19 ^c	4.6 ± 0.2 ^c

*P: mono-species *Pf*; P1: *Pf* and *Lm* S1; PSc: *Pf* and *Lm* Scott A. Mature: 20°/48h and 4°/10d; Old: 20°/144h and 4°/20d.

Table 2. Structural parameters obtained from CLSM images of the biofilms referred in Fig. 1 and Table 1.

Sample*	20 °C Biofilms				4 °C Biofilms			
	Max. BF thickness	Total Biovolume	Biovolume Reduction	Matrix/ Cells	Max. BF thickness	Total Biovolume	Biovolume Reduction	Matrix/ Cells
	(μm)	(x 1000μm ³)	(%)	Ratio	(μm)	(x 1000μm ³)	(%)	Ratio
P-mature	43 ± 7	859		0.7	23 ± 10	776		0.9
P1-mature	31 ± 5	624	27	0.7	29 ± 7	602	49	0.6
PSc-mature	39 ± 9	382	34	0.2	18 -	470	77	0.8
P-old	20 ± 1	14114		1.1	27 ± 13	349		0.7
P1-old	21 ± 3	4690	43	1.0	13 -	15	96	0.1
PSc-old	26 ± 5	3844	73	1.0	26 ± 1	155	30	0.9

*P: mono-species *Pf*; P1: *Pf* and *Lm* S1; PSc: *Pf* and *Lm* Scott A. Mature: 20°/48h and 4°/10d; Old: 20°/144h and 4°/20d.

Table 3. Structural parameters obtained from scanned coupons analyzed by ImageJ of the biofilms in the ALI: Air-Liquid Interphase and FI: Fully Immersed bands of the coupons shown in Fig. 3.

Sample*	20° C Biofilms			4° C Biofilms		
	Biomass distribution		Covered area (%)	Biomass distribution		Covered area (%)
	ALI	FI		ALI	FI	
P-mature	83 ± 8	9 ± 3	30 ± 2	82 ± 17	21 -	26 ± 7
P1-mature	7 ± 9	13 ± 4	44 ± 5	74 ± 14	8 -	19 ± 1
PSc-mature	9 ± 2	1 ± 0	28 ± 1	89 ± 9	6 ± 3	16 ± 1
P-old	34 ± 4	63 ± 4	48 ± 7	19 ± 7	75 ± 8	32 ± 3
P1-old	4 ± 4	47 ± 4	57 ± 3	20 ± 5	70 ± 9	36 ± 4
PSc-old	22 ± 5	63 ± 9	37 ± 4	15 ± 3	75 ± 5	32 ± 3

*P: mono-species *Pf*; P1: *Pf* and *Lm* S1; PSc: *Pf* and *Lm* Scott A. Mature: 20°/48h and 4°/10d; Old: 20°/144h and 4°/20d.

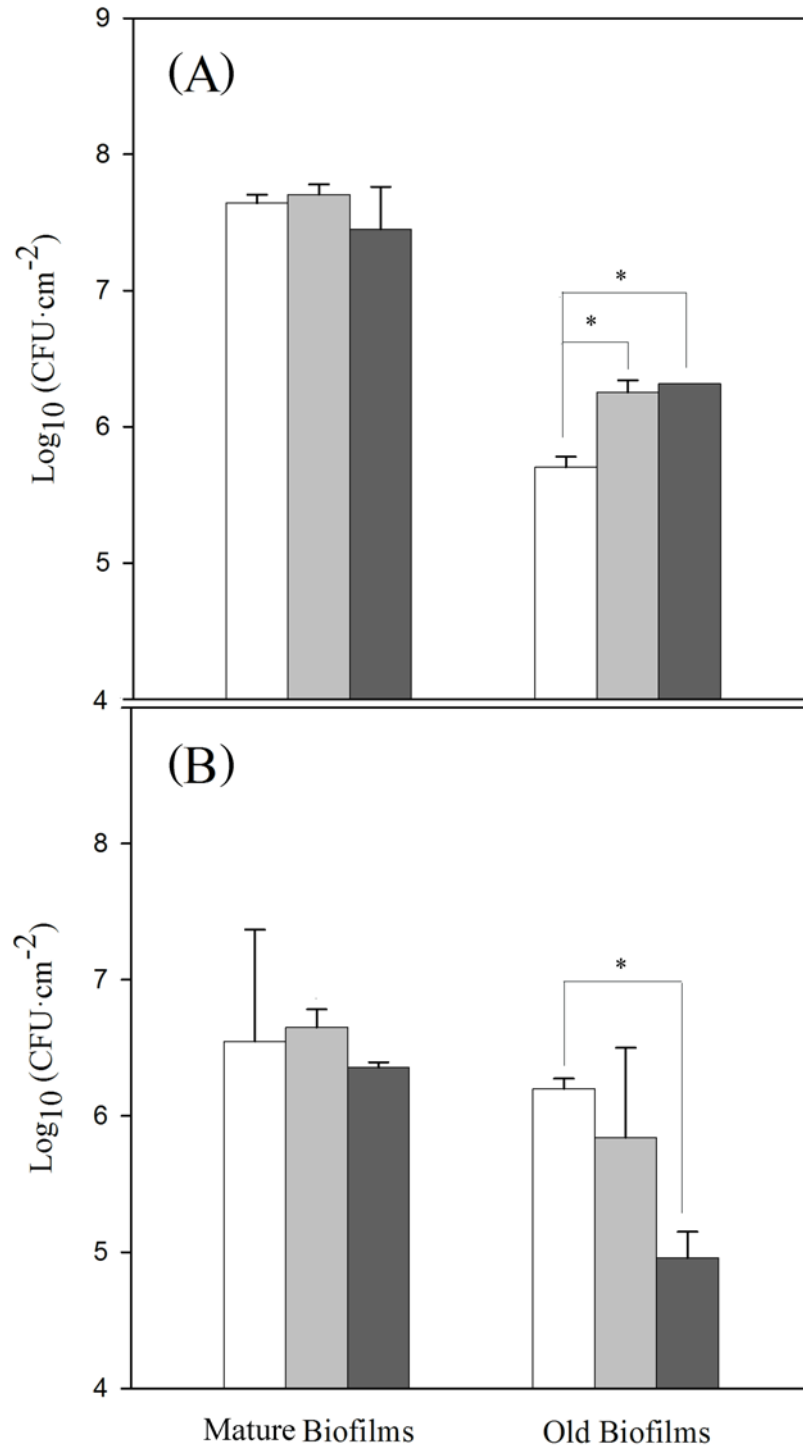


Figure 1. *P. fluorescens* biofilm population in mono-species (white bars) and dual-species biofilms with *L. monocytogenes* S1 (grey bars) or *L. monocytogenes* Scott A (black bars) developed at 20°C (A) or 4°C (B).

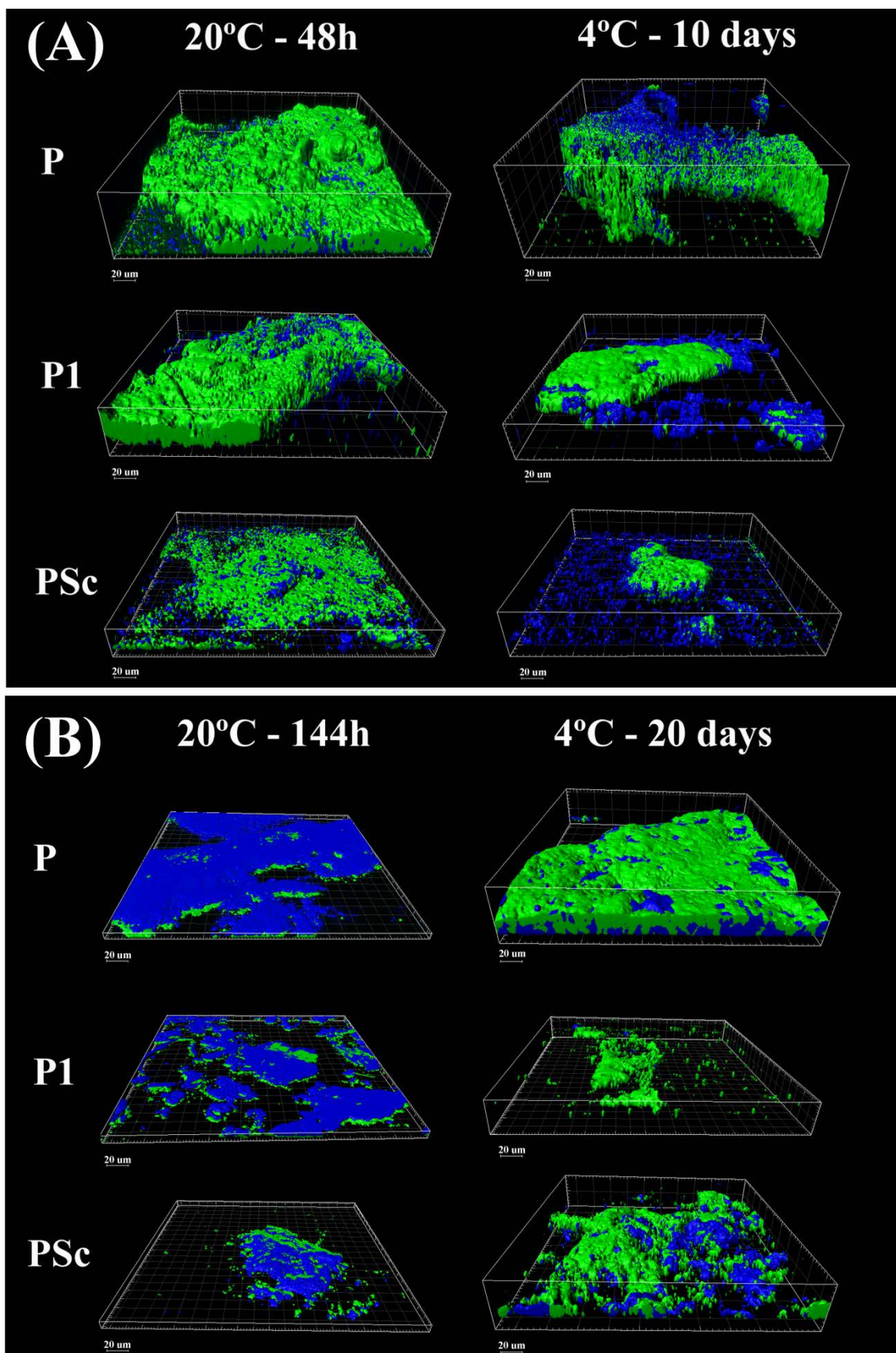


Figure 2. CLSM zenital images of mature (A) and old (B) *P. fluorescens* (*Pf*)-carrying biofilms obtained at 20°C or 4°C. Green: cells; blue: EPS matrix. P: *Pf* biofilms; P1: mixed *Pf* and *Lm* S1 biofilms; PSc: mixed *Pf* and *Lm* Scott A biofilms.

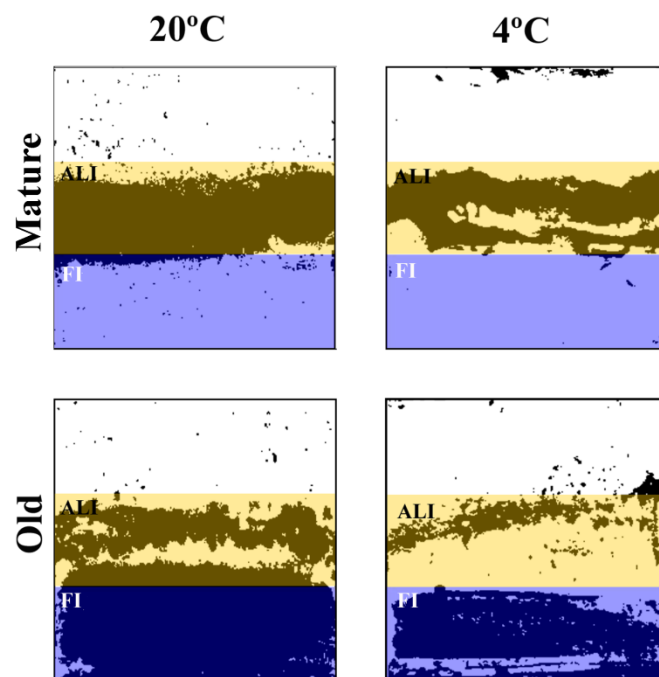


Figure 3. Scanned coupons black and white images of mature and old *P. fluorescens* mono-species biofilms. Coloured boxes represent the two different areas analyzed. Mature: 20°C/48h; 4°C/10d. Old: 20°C/144h; 4°C/20d.

8 References

- Alavi, H.E.D., and Hansen, L.T. (2013). Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling* 29, 1253-1268.
- Andreani, N.A., Martino, M.E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P., and Cardazzo, B. (2015). Tracking the blue: A MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food Microbiol.* 45, 148-158.
- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., M.H. Tsunemi, M.H., and Rall V.L.M. (2014) Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* 35, 386-391
- Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naitali, M., and Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol* 45, 167-178.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., and Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3916-3923.
- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., and Sorensen, S.J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22, 84-91.
- Carpentier, B., and Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 111-122.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1-8.
- Chan, Y.C. and Wiedmann, M. (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 237-253.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Dueholm, M.S., Petersen, S.V., Sonderkaer, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K.L., Enghild, J.J., Nielsen, J.L., Nielsen, K.L., Nielsen, P.H., and Otzen, D.E. (2010). Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol* 77, 1009-1020.
- Durack, J., Ross, T., and Bowman, J.P. (2013). Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* Exposed to Hyperosmotic and Low

- Temperature Conditions Reveal Global Stress-Adaptation Mechanisms. *PLOS ONE* 8, e73603.
- Elias, S., and Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 990–1004.
- Fox, E.M., Solomon, K., Moore J.E., Wall, P.G. and Fanning, S. (2014). Phylogenetic profiles of in-house microflora in drains at a food production facility: comparison and biocontrol implications of listeria-positive and -negative bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3369-3374.
- Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Moretro, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., and Nychas, G.J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 97, 298-309.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., and Simões M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 6, 841.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., and Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1813–1819.
- Hemery, G., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.N., Haras, D., and Orange, N. (2007). Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 49-54.
- Hoben H.J., and Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp in inoculants made from pre-sterilized peat. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1246-1247.
- Jahid, I.K., and Ha, S.-D. (2014). The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 13, 990-1011.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D., and Nielsen P.H. (2007). Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* 9, 3077-3090.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., and Rice S.A. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J.* 8, 894-907.

- Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 893–916.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., and Ross, T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 157-168.
- Moons, P., Michiels, C.W., and Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 157–168.
- Moretro, T., and Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107–121.
- Orgaz B, Lobete MM, Puga CH, SanJose C. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(1):817-28.
- Ortiz, S., Lopez, V., Villatoro, D., Lopez, P., Davila, J.C., Martínez-Suárez, J.V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens Dis.* 7, 1177-1184.
- Puga, C.H., SanJose, C., and Orgaz, B. (2014) “Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms” in *Listeria monocytogenes, food sources, prevalence and management strategies*, ed. E. C. Hambrick, Nova Publishers, New York. 115-132. Open Access item.
- Regeard, C., Mérieau, A., and Guespin-Michel, J.F. (2000) A bioluminescence assay for screening thermoregulated genes in a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 183–189.
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., and Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4491-4497.
- Rodriguez-Lopez, P., Saa-Ibusquiza, P., Mosquera-Fernandez, M., and Lopez-Cabo, M. (2015). *Listeria monocytogenes*-carrying consortia in food industry. Composition, subtyping and numerical characterisation of mono-species biofilm dynamics on stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 84-95.
- Roder, H.L., Raghupathi, P.K., Herschend, J., Brejnrod, A., Knøchel, S., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2015). Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiol.* 51, 18-24.
- Ryser, E.T., and Marth, E.H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. Third Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group.

- Sanchez-Vizuet, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D. and Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* 6, 705-717.
- Sasahara, K., Zottola, E., (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J. Food Protection* 56, 1022–1028.
- Serra, D.O., and Hengge, R. (2014) Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ. Microbiol.* 16, 1455–1471.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680.
- Simões, M., Simões, L.C., and Vieira, M.J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.* 43, 229-237.
- Srey, S., Jahid, I.K., and Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31: 572-585.
- Steinberg, N., and Kolodkin-Gal I. (2015). The matrix reloaded: how sensing the extracellular matrix synchronizes bacterial communities. *J. Bacteriol.* 197, 2092–2103.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210.
- Valderrama, W.B., and Cutter, C.N. (2013). An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 801-817.
- Warriner, K., and Namvar, A. (2009). What is the hysteria with Listeria? *Trends Food Sci. Technol.* 20, 245-254.
- Yang, L.A., Liu, Y., Wu, H., Hoiby, N., Molin, S., Song Z.J. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 3, 74-81.
- Zhou, Y., Smith, D., Leong, B.J., Brännström, K., Almqvist, F., and Chapman, M.R. (2012). Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *J. Biol.Chem.* 287, 35092–35103.

9 Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

CAPÍTULO III

*Cold stress and presence of Pseudomonas fluorescens affect
Listeria monocytogenes biofilm structure and response to chitosan*

Aceptado en Journal of Molecular and Genetic Medicine (2015)

Cold stress and presence of *Pseudomonas fluorescens* affect *Listeria monocytogenes* biofilm structure and response to chitosan

Puga, CH*; Orgaz, B; Muñoz, S and SanJose, C

Department of Nutrition, Food Science and Technology, Veterinary Faculty, University Complutense of Madrid (UCM), 28040-Ciudad Universitaria, Madrid, Spain.

* Corresponding author. Tel.: 00 34 91 394 4091; fax: 00 34 91 394 3743.

E-mail address: chpuga@vet.ucm.es

1 Abstract

Life in biofilms (BF) provides microorganisms with protection against different adverse conditions and agents. In food industry, as they can host and transfer to food both pathogenic and spoilage microorganism, they have to be constantly kept under control. Many hygienic practices and disinfectants aim at preventing and/or destroying BF, and chitosan has a promising future in this respect. *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a dangerous foodborne pathogen that can live in BF and survive many restrictive conditions used to preserve foods, such as refrigeration. In this work, nine *Lm* strains, persistently or sporadically isolated from a meat processing plant, were cultured at 20°C and 4°C to obtain BF either in isolation or with *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*), both species being simultaneously inoculated at similar low population levels. *Pf* was more compatible with the persistent *Lm* strains than with the rest, enhancing or maintaining their viable counts in the corresponding dual species BF. All dual species BF formed at 4°C were much thinner than those formed at 20°C. Chitosan damage was observed both as reduction of *Lm* viable cells and by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with a Live/Dead stain. In *Lm* monospecies BF, 1h chitosan exposure reduced viable counts between 3 and 6 Log when cultured at 20°C and 2-4 Log when at 4°C. Both temperature of BF formation and *Lm* strain affected their susceptibility to chitosan in dual species BF. CLSM showed focalized chitosan injuries in binary BF, particularly in those with persistent *Lm* strains.

Keywords: Chitosan; *Listeria monocytogenes*; *Pseudomonas fluorescens*; Mixed biofilms; Low temperature; CLSM; Food safety; Biofilm structure

2 Introduction

Listeria monocytogenes (*Lm*) emerged as a “new” human pathogen in the 1980s, with several high profile food-associated listeriosis outbreaks. The case fatality rate is now in Europe of 15.6% but is still close to 30% in other locations. The EU notification rate was in 2013 of 0.44 per 100,000 population, which represented an 8.6 % increase compared with 2012 [1]. In the US, listeriosis accounted for approximately 28% of the deaths and the highest hospitalization rate (91%) caused by known food-borne infections [2]. Transmission through contaminated food has been conclusively demonstrated to account for 99% of both outbreak and sporadic cases of listeriosis. Food types most often associated to listeriosis are Ready-To-Eat (RTE) foods (processed products that can be consumed directly as sold, without a previous hygienization step) that can support the growth of *Lm*: soft cheeses, marinated and smoked fish, deli salads and certain deli meat products, apart from uncooked or undercooked foods. Norms regarding *Lm* tolerance in retail foods are among the most strict ones in the microbiological food safety field.

A biofilm (BF) can be defined as a sessile community of microbial cells irreversibly associated with a surface and embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that they produce themselves; those cells display an altered phenotype with respect to gene expression, protein production and growth. Among phenotypic differences are loss of mobility appendages, production and secretion of EPS, adaptation to different degrees of anaerobiosis (depending on the cell’s depth inside the matrix), higher ability to destroy active oxygen molecular species and much slower growth rate than their free, planktonic counterparts. It has been estimated that 80% or more of the world’s microbial mass live in BF. In the food context, BF formation is a problem for food safety and quality, since it may harbour pathogens, such as *Lm* [2] and also spoilage organisms in food processing plants and even transfer them directly into hygienized foods. Besides, life in BF confers its dwellers an increased resistance to many chemical or biological hostile agents [3,4].

Though monospecies BF have been for long the most frequent experimental form of BF, multispecies BF are far more common in everyday life; they are in fact considered to be the prevalent form of life in natural and artificial environments [5]. Sustained coexistence in the same BF implies compatibility between species and a cooperative or at least neutral ecological interaction between them. Mixed BF provide even more protection than monospecies BF, so there is increasing interest to identify at least the most common of the actual partners in the BF formed on certain raw foods or food industry processing surfaces, to reproduce them in model BF, to use as targets to test the efficiency of new hygienization agents such as chitosan [6].

To identify the most common real BF partners, repeated samplings of the same sites are usually performed, to discard sporadic contaminants. Microbial strains repeatedly isolated from the same industrial surfaces along extended periods of time (several months or even years) are called persistent. Ortiz et al. (2010) [7] have collected a set of persistent and another set of non persistent *Lm* strains from an Iberian pig slaughterhouse

and meat processing plant and have tried to identify differences between them. Though bacterial persistence is not thought to be a phenotypic trait [8] it is presumably based on selective advantages to withstand the stress conditions prevailing at a given location. Some of those advantages are probably very specific for the site, whereas others are likely to be of a more general character. Some authors however claim differential gene expression in certain persistent *Lm* strains [9].

We have previously studied some of the strains of Ortiz collection and have observed that persistent *Lm* strains recover more quickly than non persistent ones from the damages caused on BF by chitosan exposure [10]. Our interest in chitosan as cleaning and disinfection agent relies on previous encouraging antibiofilm results [11] and good sustainability perspectives. In this work, we have extended those studies to dual species *Lm/Pf* BF and low temperature conditions, as both mixed BF and refrigeration are realistic issues in food industry.

3 Materials and Methods

3.1 Bacterial strains

Pseudomonas fluorescens ATCC 948TM (*Pf*), the reference *Listeria monocytogenes* (*Lm*) strain, *Lm* Scott A (serotype 4b, lineage I), and nine *Lm* environmental strains isolated from an Iberian pig slaughterhouse and processing plant by Ortiz et al (2010) [7] were used as biofilm (BF) former organisms. The latter were recovered over a period of three years, identified and characterized by serotyping and PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) by the same authors. Six of these *Lm* strains were classified as persistent (their name is followed by a p, such as 1p) as they were repeatedly sampled over a large timespan (from 1 to 3 years). The other three were considered non persistent ones (Table 1). All were stored at -20°C in Tryptone Soya Broth (TSB) (OXOID, Basingstoke, UK) supplemented with 15% glycerol. Preinocula were obtained after overnight culture in TSB/20°C. Cells were harvested by centrifugation at $4000 \times g$ for 10 min, washed twice in sterile TSB and their OD₆₀₀ adjusted in order to reach 10^3 CFU·mL⁻¹ of each bacterium after inoculation, both in single and binary cultures.

3.2 Experimental system

BF were developed on single-use 22 × 22 mm thin, borosilicate commercial microscope glass coverslips. As described in Orgaz et al., 2011 [11] 16 coverslips were held vertically by marginal insertion into the narrow radial slits of a Teflon carousel platform (6.6 cm diameter). The platform and its lid were assembled by an axial metallic rod for handling and placed into a 600 mL beaker. The whole system, i.e. coverslips, carousel and the covered 600 mL beaker, were heat-sterilized as a unit, before aseptically introducing 60 mL of inoculated TSB. For dual species BF, containing *Pf* and one of the ten *Lm* strains afore mentioned, both bacteria were inoculated at the same level (10^3 CFU/mL). *Lm* monospecies BF were used as controls. Incubation was carried out at 20°C/48h or

4°C/20d, in a rotating shaker at 80 rpm. Under these conditions, BF growth occupied about 70% of the coverslip's surface.

3.3 Antimicrobial testing

Chitosan with $\geq 75\%$ deacetylation degree was purchased from SIGMA ALDRICH (St. Louis, Mo., USA). A 1% (w/v) chitosan solution was prepared in 1% (v/v) acetic acid for testing its antibiofilm properties. For chitosan treatment of the BF, the coverslips were aseptically extracted from the carousel platform with sterile tweezers and washed by dipping in sterile NaCl (0.9% w/v), in order to eliminate weakly attached cells. They were individually immersed into Falcon test tubes containing 15 mL of the sterile chitosan cleaning solution, for 1h at room temperature. After treatment, the washing step with 0.9% NaCl was repeated before cell recovery and counting.

3.4 Cell recovery and counting

For cell recovery and counting of residual BF dwelling cells, loosely attached cells were removed by swabbing both coverslip faces. The rest were then transferred into 1.5 mL of peptone water in tubes that were vigorously stirred in a vortex to break up cell aggregates, diluted in peptone water and plated into the indicated culture media according to the drop method [12]. In dual BF, selective media (OXOID) were used for plating: PALCAM Agar Base for *Lm* and *Pseudomonas* Agar Base (PAB) for *Pseudomonas*. In monospecies BF, general medium Tryptone Soya Agar (TSA, OXOID) was used. Colonies were counted after 48h incubation at 37°C or 30°C, for *Lm* or *Pf*, respectively. Untreated control samples were processed for cell recovery and counting as described before, and considered as controls having 100% of attached cells. Chitosan efficiency was expressed as Log reduction of *Lm* attached cells.

3.5 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

The effect of chitosan on BF structure and cell damaged was evaluated by CLSM. Images were obtained using a FLUOVIEW® FV 1200 Laser Scanning Confocal Microscope (OLYMPUS, Tokyo, Japan). For CLSM observation, BF developed in glass coverlips were rinsed with sterile 0.9% NaCl before being stained with LIVE/DEAD® viability kit (L10316, LIFE TECHNOLOGIES, Madrid, Spain), including SYTO 9, which labels all bacteria in a population, both those with intact membranes and those with damaged ones and propidium iodide, which only penetrates in cells with damaged membranes. Thus, for image analysis, green corresponds to living cells and red to dead or damaged cells. For image analysis, firstly the total area of the coupon was observed with a 2X objective. Then, selected representative areas within a region were observed with a 10X objective and finally, the 60X immersion objective was used to obtain 0.12 x 0.12 mm images. Three-dimensional projections (Maximum Intensity Projection, MIP) were reconstructed from z-stacks using IMARIS® 7.6 software (BITPLANE AG, Zurich, Switzerland).

3.6 Statistical analysis

At least two independent experiments were performed and four coupons were sampled each time, in total $n=8$. Data were analyzed using ONE-way ANOVA, STATGRAPHICS PLUS 5.0 software (STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION, Rockville, Md., USA). Mean comparisons were carried out to determine significant differences at a 95.0% confidence level ($p < 0.05$).

4 Results and Discussion

4.1 Temperature and *P. fluorescens* effect on viable biofilms *L. monocytogenes* counts

When BF were cultured at 20°C with *Lm* as a single species, both persistent and non-persistent strains attained similar cell densities after 48h incubation (Table 2). When cultured at 4°C however, 10-fold longer times were needed for *Lm* to reach comparable counts. Cell densities attained by persistent and sporadic strains in BF at both temperatures were almost the same. Scott A strain also formed BF with similar cell densities as the food industry environmental *Lm* strains used.

No differences associable to serotype or lineage (Table 1) were noticed. Some authors have tried to associate BF forming ability with persistence without conclusive results; culture conditions may be critical in this respect [10, 13].

The effect of adding *Pf* on BF *Lm* counts, when both species started the culture with the same inoculum size, as in this case, depended on *Lm* strain and temperature (Table 2). The interaction's outcome was moderately negative (in most cases, less than 1 Log) on *Lm* BF counts of all non persistent strains, regardless of culture temperature. On those BF with persistent *Lm* strains, however, *Pf* had a variable effect, depending on temperature and each *Lm* particular strain (Table 2). Scott A counts in binary BF increased with respect to those in pure BF at 20°C but not at 4°C; an interaction pattern close to that of the persistent strains.

According to these results, *Lm* strains matter regarding cooperation between these two species in BF. These sporadic *Lm* strains, seemed to be as a rule less compatible with *Pf* in BF than the persistent ones. It could be reminded that all these environmental isolates came from a meat product plant where various *Pseudomonas* are likely to be more frequent than *Lm*. Sasahara & Zottola [14] first studied *Pseudomonas (fragi)* influence on *Listeria* being incorporated into BF, in a pioneer work published in 1993. Using a scanning electron microscopy technique, they described a positive influence of *Pseudomonas* on *Listeria* attachment, highlighting the role of *Pseudomonas* as a primary colonizer, critical to bind *Lm* to surfaces in significant numbers. Many studies on the ecological relationships in BF between *Lm* and other bacteria have kept assuming that, though *Lm* can form its own BF, though thin and sparse [15]. Though experimental

conditions are difficult to compare, not all bacteria and not even all *Pseudomonas* tested, positively contribute to *Lm* attachment [16-18]. Besides strain differences, aspects such as the absolute and relative size of the respective species inocula and the sequence of access to the substratum surface, are likely to influence the interaction's outcome.

4.2 Temperature effect on dual species biofilms structure

Figure. 3 shows the tridimensional structure of the dual species BF formed at 20°C (*warm*) and 4°C (*cold*) of *Pf* with three *Lm* strains, persistent 10p, non persistent 6 and ScottA. The images of control BF, before chitosan exposure, are shown in the first and third columns. Though there was not a large difference in average viable cells of *Lm* per square centimeter of the coupons supporting binary BF formed at 4 or 20°C (Table 2), all-cell densities per cubic cm of the microcolonies (as seen by CLSM) were much higher at 4°C (not shown) since BF formed under refrigeration were much thinner (Fig.3) with a much smaller matrix volume per cell [17]. Thickness values of *cold* binary BF were 16, 38 and 54% of the respective values in *warm* ones for strains 10p, 6 and Scott A.

It should be reminded that *Pseudomonas* grows more quickly and produces much more matrix in these conditions than *Lm* [17] so, much or may be most of the dual species BF thickness, is probably due to *Pf*. The reasons behind the thinner matrix of the *cold* *Pf/Lm* BF are still unknown, but cold stress modulates specifically the expression of some genes involved in BF formation in *Pf* [19] and *Lm* [20,21].

Figure. 3 also shows different patterns of surface coverage of the binary BF, depending on temperature and *Lm* strain involved. At 20°C, *Pf* with all the three tested *Lm* strains gave rise to an even, homogeneous coverage. At 4°C that was only the case of the persistent *Lm* strain (10p); the others provided a dense but patchy coverage as if, in the process of BF formation, cell adhesion had been slower or more impaired than adhered cell multiplication.

Presence and distribution of dead or severely damaged cells also differed among the control dual species BF (Fig. 3). Those with the persistent *Lm* strain 10p showed a significant amount of dead cells across the thickness of both the *warm* and *cold* BF. *Warm* BF controls with the non persistent *Lm* strain 6 showed fewer, homogeneously dispersed dead cells, but in *cold* ones, dead cells appeared predominantly in the void spaces not covered by microcolonies.

The underlying mechanisms for death or damage of these (*Pf* or *Lm*) cells are probably different for the two types of *Lm* strains. Let us remember that non persistent *Lm* populations in BF were not enhanced by *Pf* co-culture; may be those easily damaged cells, excluded to the BF surface or in void spaces, could be *Lm* cells that failed to be sheltered or protected in the *Pf* matrix.

4.3 Chitosan effect on *L. monocytogenes* and *L. monocytogenes* / *P. fluorescens* biofilms: viable cells

The results on *Lm* of 1h exposure of *warm* BF to 1% chitosan, expressed as log reductions of *Lm* viable counts, are shown in Figure 1. In *warm* monospecies BF, inactivation efficiency ranged between 3 and 6 log; variations in susceptibility depended on *Lm* strain, but could not be associated to serotype, lineage or persistent character. Two of the *Lm* strains, the persistent 17p and the non persistent 6, were clearly more susceptible than average in those *warm* monospecies BF (over 5 log reduction). *Cold* *Lm* monospecies BF, were in general less susceptible to chitosan's treatment than *warm* ones (Fig. 2). Inactivation efficiency ranged between 2 and 4 log (3 on average). 17p and number 6 strains were also the more susceptible strains in both *cold* and *warm* *Lm* monospecies BF.

Variations in chitosan susceptibility of *Lm* in BF related to *Pf* presence and temperature were observed. In general, in *warm* BF, *Lm* was less susceptible to chitosan in dual species than in mono species BF (Fig.1); actually, *Pf*'s company protected from chitosan seven out of the ten *Lm* tested species (up to 2 log). Scott A was also less susceptible to chitosan in binary BF, either *cold* or *warm*, than in single species BF. Our results on *Lm* protection against chitosan obtained with *warm* binary BF coincide with what has been published by many authors on the increased resistance to sanitizers in mixed BF [22, 23], particularly in the case of *Lm* and quaternary ammonium compounds. *Lm* has several mechanisms that improve the ability of this microorganism to adapt and survive at low temperatures [20]. Modifications in surface hydrophobicity and membrane fatty acid composition, for instance, may affect biocide penetration.

Our results on chitosan susceptibility of *Lm* in *cold* BF (Fig. 2) were in several ways, unexpected. For one thing, all environmental food industry *Lm* strains were less chitosan susceptible in *cold* mono species BF than in *warm* ones. Besides, in contrast with what was observed in *warm* BF, co-culture with *Pf* increased chitosan susceptibility of several *Lm* strains in *cold* binary BF. More precisely, four *Lm* strains, all persistent ones, became more chitosan sensitive (in *cold* binary BF than in *cold* single species BF), three became less sensitive (including Scott A) and another three showed no difference in sensitivity.

It seems therefore that low temperatures determine a particular mode of growth for *Pf* and *Lm* (may be not the same for all *Lm*), possibly another kind of interaction between the two species and in turn, a different BF structure, resulting in a different response to chitosan action. It is obvious that BF development at low temperature deserves much further study, for food safety reasons.

4.4 Changes on biofilm's structure induced by chitosan

The effect of chitosan treatment was also studied by confocal microscopy. Figure 3 shows at relatively large scale (x60) the structure and the amount and distribution of dead and live cells (of either *Lm* or *Pf*) in *cold* or *warm* binary BF formed by *Pf* and three *Lm*

strains (persistent 10p, non persistent 6 or Scott A) before and after exposure to chitosan. Apart from the persistence trait, the two environmental strains chosen to obtain images had their own peculiarities. 10p BF were among the more resistant to chitosan (less than 3 log reduction) irrespective of temperature and *Pf* company. In contrast with that, strain 6 BF were much more susceptible to chitosan than average and *Pf* company substantially protected *Lm* in binary BF, irrespective of the temperature at which they were formed. As chitosan targets, binary BF with strain p10 or 6 can therefore be presumed to have relatively different properties.

The effect of chitosan on BF biovolume was much smaller than on viable cells, never above 50% of the total biomass and sometimes negligible (not shown). It gave rise however to CLSM-visible “injuries” in BF structure that differed depending on *Lm* strain (Fig. 3). On both *warm* or *cold* BF carrying the persistent *Lm* strain 10p, typical injuries appeared as rather large perforations or holes, from which cells had been detached. Injuries caused by chitosan on the *warm* binary BF of non persistent *Lm* strain 6 (Fig. 3) were also localized, but instead of large holes, they were just small cavities or pits.

As a matter of fact, 1% chitosan in 1% acetic acid is a well dispersed, but rather viscous preparation. Low diffusion speed may favour a focalized reaction process, possibly not just a direct action of chitosan but a cooperative set of events, whose effects could slowly expand during exposure time. Local degradation of chitosan could be caused by enzymes produced by BF embedded cells, giving rise to chitooligosaccharides, sometimes more active against microorganisms than the large MW molecules [6]. Chitosan can be hydrolyzed unspecifically by many different enzymes, including proteases [24, 25] and certainly also by chitinases, which have been reported to be produced by, or elicited in, *Listeria* and other bacteria [26-28]. The differences in morphological damages at the microcolony level (holes, pits, etc.) could be based on the amount and type of extracellular enzymes degrading chitosan produced by the different strains. Hollows in different types of BF occurring by not biocide-related mechanisms of “seeding dispersal”, have been appraised by Kaplan (2010) [29]. Young (1982) [30] suggested that chitosan could open pores on vegetal polygalacturonic layers by sequestering the Ca that stabilizes its gel structure; that could also break the polymeric network of the BF matrix.

In conclusion, regarding environmental strains of *Lm* in dual species BF with *Pf*, it could be said that BF formed at 4°C were remarkably thinner, more compact and more cell dense than those formed at 20°C. The ecological interaction outcome between the two species was, for *Lm*, neutral or positive in the case of persistent strains and negative (about one Log) for non persistent ones. Both the pattern of species interaction and the temperature-dependent mode of growth seem to have a relevant role on the effects of chitosan exposure, which were more significant on viable *Lm* cells than on BF biomass.

5 Acknowledgments

The authors specially thank to Dr. JV. Martinez-Suarez for kindly providing the environmental strains of *Lm*, the Cytometry and Fluorescence Microscopy Center of the University Complutense of Madrid for its skillful assistance and the Spanish Ministry of Economy and Competition for funding project AGL2010-22212-C02-01.

6 Tables and figures

Table 1. *Listeria monocytogenes* strains. Environmental *Listeria monocytogenes* strains, selected from those isolated by Ortiz et al. (2010) from a slaughterhouse and meat processing plant.

<i>Strain name</i>	<i>PFGE type</i>	<i>Serotype</i>	<i>Lineage</i>	<i>Persistency</i>
1p	S1	1/2a	II	+
2p	S2	1/2a	II	+
4p	S4-1	1/2b	I	+
5p	S5	1/2c	II	+
10p	S10-1	1/2a	II	+
17p	S17-1	1/2b	I	+
6	S6	1/2a	II	
11	S11	1/2a	II	
18	S18	1/2b	I	

Table 2. Effect of *Pf* presence on the amount (Log_{10}) of *Lm* in biofilms from cultures at 20 and 4°C. Figures from binary cultures with asterisk are statistically different ($p < 0.05$) from their respective pure culture control ($n=8$).

<i>Lm</i> strain	20° C - 48 hours		4° C - 20 days	
	<i>Pure Lm</i> biofilms	<i>Binary</i> <i>biofilms</i> <i>Lm+Pf</i>	<i>Pure Lm</i> biofilms	<i>Binary</i> <i>biofilms</i> <i>Lm+Pf</i>
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
1p	5.89 \pm 0.52	6.62 \pm 0.62*	5.36 \pm 0.39	5.71 \pm 0.33
2p	6.26 \pm 0.37	6.24 \pm 0.62	5.79 \pm 0.25	5.61 \pm 0.37
4p	6.25 \pm 0.28	7.23 \pm 0.33*	5.31 \pm 0.35	6.22 \pm 0.55*
5p	6.21 \pm 0.42	6.15 \pm 0.37	5.71 \pm 0.33	5.8 \pm 0.38
10p	5.87 \pm 0.44	6.5 \pm 0.56*	5.49 \pm 0.55	5.13 \pm 0.30
17p	6.14 \pm 0.51	5.94 \pm 0.55	5.78 \pm 0.23	5.15 \pm 0.40*
6	6.22 \pm 0.39	5.48 \pm 0.72*	4.98 \pm 0.53	4.15 \pm 0.48*
11	6.27 \pm 0.12	5.36 \pm 0.27*	5.02 \pm 0.36	3.42 \pm 0.20*
18	6.17 \pm 0.16	5.32 \pm 0.13*	5.29 \pm 0.14	4.17 \pm 0.53*
Scott A	6.21 \pm 0.51	6.9 \pm 0.25*	4.98 \pm 0.40	4.29 \pm 0.32*

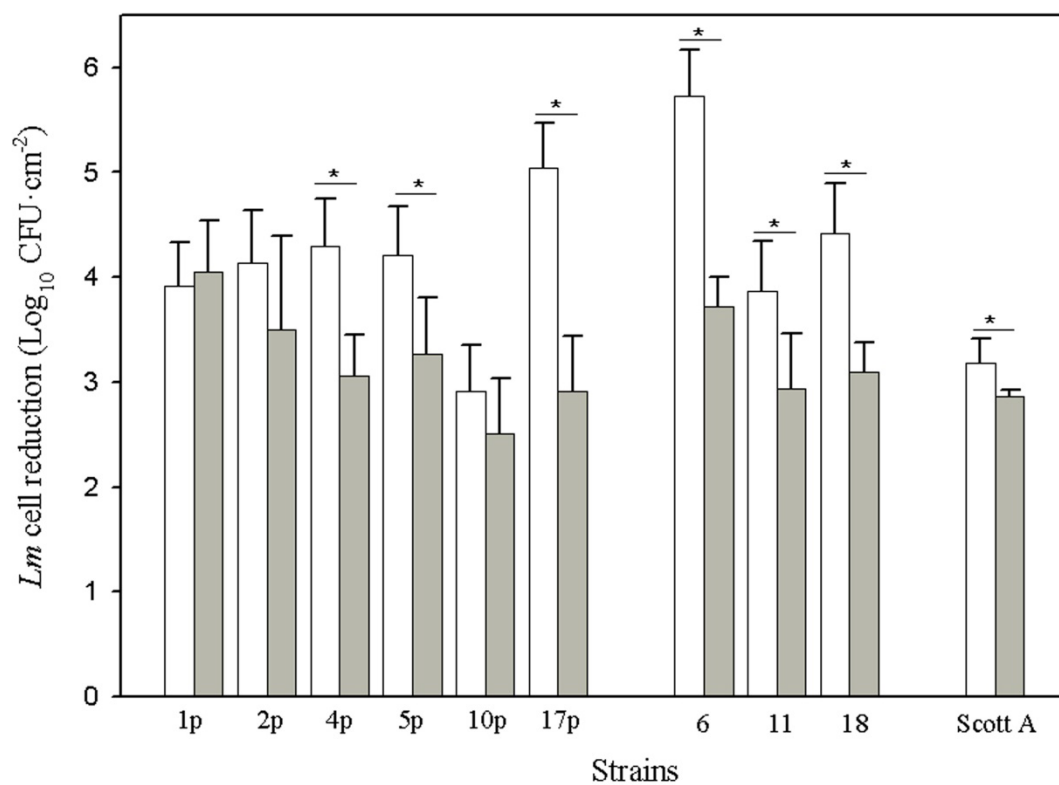


Figure 1. Chitosan effect against *warm biofilms*. Log reduction of *Lm* viable cells in pure (white bars) and binary (gray bars) 48h/20°C biofilms after their exposure to 1% chitosan for 1h. Asterisks mark statistical differences ($p < 0.05$) between pure and binary figures (n=8).

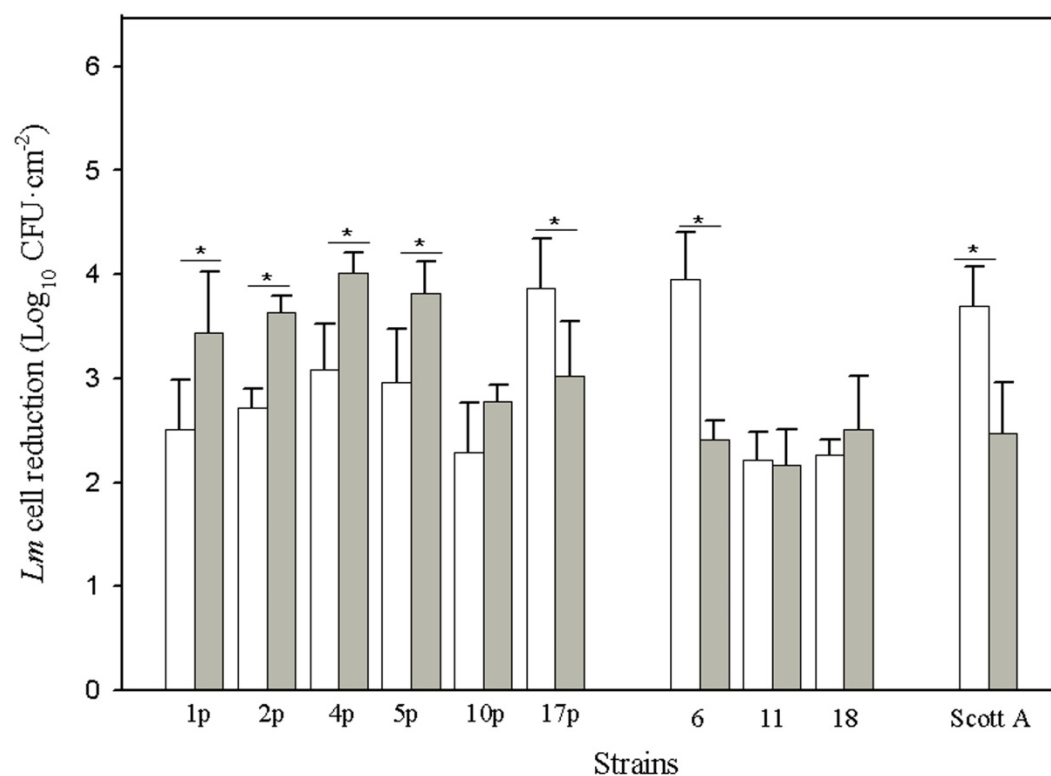


Figure 2. Chitosan effect against *cold* biofilms. Log reduction of *Lm* viable cells in pure (white bars) and binary (gray bars) 20 d/4°C biofilms after their exposure to 1% chitosan for 1h. Asterisks mark statistical differences ($p < 0.05$) between pure and binary figures (n=8).

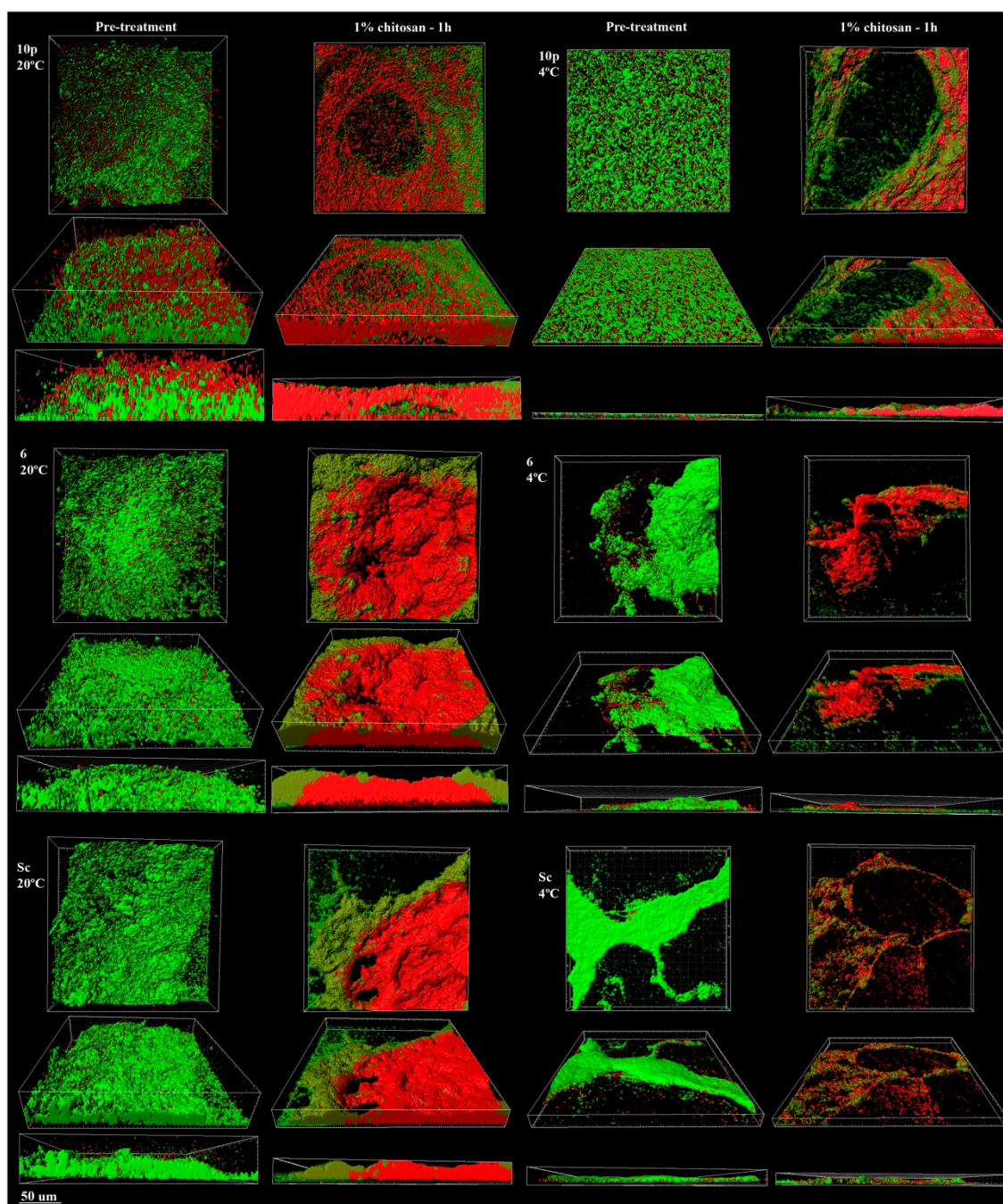


Figure 3. Structural changes in binary biofilms due to culture temperature and chitosan treatment. CLSM zenital, sagital and x-y sections images of binary biofilms formed after 48h/20°C (left) or 20 days/4°C (right) by *Lm* strains 10p, 6 or Scott A, in presence of *Pf*, before and after 1h exposure to 1% chitosan. BF were stained with Live-Dead Kit; i.e. live cells in green (*Lm* and *Pf*); damaged or dead cells, in red (*Lm* and *Pf*).

7 References

1. EFSA (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal 13(1):3991
2. Møretrø T, Langsrud S (2004) *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. Biofilms 1:107-121.
3. Shi X, Zhu X (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. Trends Food Sci Tech 20: 407-413.
4. Srey S, Jahid IK, Ha SD (2013) Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control 31: 572-585.
5. Elias S, Banin E (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiol Rev 36: 990-1004.
6. No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z (2007) Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. J Food Sci 72: R87-R100.
7. Ortiz S, Lopez V, Villatoro D, Lopez P, Martinez-Suarez JV, et al (2010) A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. Foodborne Path and Dis 7:1177-1184.
8. Carpentier B, Cerf O (2011) Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol 145:1-8.
9. Mazza R, Mazzette R, McAuliffe O, Jordan K, Fox EM (2015) Differential gene expression of three gene targets among persistent and non persistent *Listeria monocytogenes* strains in the presence or absence of benzethonium chloride. J Food Protection 78: 1569-1573.
10. Orgaz B, Puga CH, Martinez-Suarez JV, SanJose C (2013) Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. Food Control 32:484-489.
11. Orgaz B, Lobete MM, Puga CH, SanJose C (2011) Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. Int J Molec Sci 12:817-828.
12. Hoben HJ, Somasegaran P (1982) Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp in inoculants made from pre-sterilized peat. Appl Environ Microbiol 44:1246-1247.
13. Ochiai Y, Yamada F, Mochizuki M, Takano T, Ueda F et al (2014) Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains. J Food Protection 77:133-140.

14. Sasahara KC, Zottola EA (1993) Biofilm formation by *Listeria-monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. J Food Protection, 56:1022-1028.
15. Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmyn D, Piveteau P, et al (2008) *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. Appl Environ Microbiol, 74:4491-4497.
16. Carpentier B, Chassaing D (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. Int J Food Microbiol 97:111-122.
17. Puga CH, SanJose C, Orgaz B (2014) Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms. In *Listeria monocytogenes*, food sources, prevalence and management strategies. New York, USA, Nova Publishers: 115-131. Open Access.
18. Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretrø T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas G-J, Kacániová M, Czaczyk K, Ölmez H and Simões M (2015) Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Front. Microbiol. 6: 841.
19. Hemery G, Chevalier S, Bellon-Fontaine MN, Haras D, Orange N (2007) Growth temperature and *OprF* porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. J Ind Microbiol Biotech 34: 49-54.
20. Chan YC, Wiedmann M (2009) Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. Crit Rev Food Sci Nutr 49: 237-253.
21. Durack J, Ross T, Bowman JP (2013) Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms. PLOS ONE 8(9): 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073603>.
22. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ (2009) Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. Water Res 43:229-237.
23. Jahid IK, Ha S-D (2014) The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. Comprehensive Rev Food Sci Food Safety 13:990-1011.
24. Kumar ABV, Gowda LR, Tharanathan RN (2004) Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products. Euro J Biochem 271:713-723.

25. Orgaz B, Neufeld RJ, SanJose C (2007) Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enz Microb Tech* 3:1045-1051.
26. Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J (2011) Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25:170-179.
27. Frederiksen RF, Paspaliari DK, Larsen T, Storgaard BG, Leisner JJ, et al (2013) Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology-SGM* 159:833-847.
28. Chaudhuri B, Bhadra D, Dash S, Sardar G, Chaudhuri BK, et al (2013) Hydroxyapatite and hydroxyapatite-chitosan composite from crab shell. *J Biomaterials Tissue Eng* 3:653-657.
29. Kaplan JB (2010) Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dental Res* 89:205-218.
30. Young DH, Kohle H, Kauss H (1982) Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol* 70:1449-1454.

CAPÍTULO IV

Listeria monocytogenes biofilm association to other species, persistence and revival after chitosan exposure

Food Control (En revisión, 2015)

***Listeria monocytogenes* biofilm association to other species, persistence and revival after chitosan exposure**

Puga, CH^a., SanJose, C^a. and Orgaz, B^{a*}.

^a Department of Nutrition, Food Science and Technology. Faculty of Veterinary. University Complutense of Madrid. Avda Complutense s/n. 28040-Madrid. Spain

* Corresponding author: belen@vet.ucm.es

1 Abstract

The persistence of certain *Listeria monocytogenes* (*Lm*) strains in the food industry is a concerning food safety issue. Most of the studies that link persistence with other features, such as biofilm (BF) formation and tolerance to antimicrobials, are conducted at different temperatures from those generally used in food facilities. In this work, two *Lm* strains, one persistent and one sporadic, plus the reference strain Scott A were cultivated alone and with *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) to form BF at 20°C (*warm*) and 4°C (*cold*). In both systems, we evaluated the ability of *Lm* cells to recover after chitosan treatment. Structural changes after chitosan exposure and over the revitalization period were analysed using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Lm* cells were more tolerant to chitosan in *cold* *Lm/Pf* BF, although their counts reached higher levels in *warm* dual-species BF. Whereas the persistent-strain recovered almost at the same pace with or without *Pf*, the presence of this secondary species was crucial for the non-persistent *Lm* strain recovery, especially in *cold* BF. Structural changes induced by chitosan differed in *warm* and *cold* BF, as well as their recovery patterns, suggesting that low temperatures affect BF structure and thus modify *Lm* tolerance to antimicrobials. These findings are relevant to the design of realistic BF control strategies in the food industry, where most of the products must be handled in a refrigerated supply chain.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; dual-biofilms; cold stress; chitosan; persistence; CLSM; recovery

2 Introduction

Listeria monocytogenes (*Lm*) can persist in food processing facilities for extended periods of time (Keto-Timonen, Tolvanen, Lundén, & Korkeala, 2007; Ortiz et al., 2010) and can eventually be transferred from food contact surfaces to food. Although its incidence is relatively low compared to other zoonotic agents (the EU notification rate was 0.44 cases per 100,000 population), the EU case-fatality rate due to listeriosis was the highest, at 15.6% (191 of deaths due to listeriosis were reported in the EU in 2013) (EFSA, 2015). The features by which certain *Lm* strains persist in food environments are not fully understood to date. Nevertheless, it seems that their association with other microorganisms, most likely forming multispecies biofilms (BF), can be beneficial for this problem (Carpentier & Cerf, 2011; Srey, Jahid, & Ha, 2013; Jahid & Ha, 2014 Valderrama & Cutter, 2013).

Biofilms are microbial communities that grow attached to surfaces and are embedded in an extracellular matrix (ECM) produced by themselves (Donlan & Costerton, 2002). In real environments, BF's are frequently formed by different species that share the same niche (Elias & Banin, 2012). In general, interspecies interactions can modify for better or worse the tolerance pattern towards antimicrobials of each strain that is present (Giaouris et al., 2015; Simões, Simões, & Vieira, 2009). Concerning *Lm*, the effect of its associations with others in mixed-BF has been described as positive, neutral or even detrimental, depending on the partners, the antimicrobials used and the culture conditions (Giaouris, Chorianopoulos, Doulgeraki, & Nychas, 2013; Kostaki, Chorianopoulos, Braxou, Nychas, & Giaouris, 2012; Lourenço, Machado, & Brito, 2011; van der Veen & Abee, 2011).

Growing under stress conditions may also change interspecies interactions as bacterial fitness differs (Valderrama & Cutter, 2013). For instance, *Lm* gathered multiple traits that benefit its predominance over other species in the hostile environments found in the food industry. Indeed, this microorganism exhibits a great ability to overcome different stress conditions, such as desiccation, starvation, low pH and low temperature (Bergholz, Bowen, Wiedmann, & Boor, 2012; Chaturongakul, Raengpradub, Wiedmann, & Boor, 2008).

In food plants, most of the zones along the processing lines are maintained under refrigeration temperatures (usually lower than 5°C), especially those such as cleanrooms where Ready to Eat (RTE) foods are being processed. When testing antimicrobials intended for the food industry, this fact is often disregarded and target BF's are cultivated at relatively high temperatures. Nevertheless, the persistence of certain strains could be somehow related to enhanced low temperature adaptation mechanisms (Cabrita, Trigo, Ferreira, & Brito, 2015; Lourenço et al., 2011; Ochiai et al., 2014).

For food safety reasons, it is though crucial determination whether cultivation at low temperatures and the presence of a secondary specie modifies *Lm* tolerance towards antimicrobials. For this, we developed *Lm/Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) dual-species

BF at two temperatures, 4°C (*cold* BF) and 20°C (*warm* BF). The *Lm* strains used herein were isolated from an Iberian pig slaughterhouse by Ortiz et al., (2010) and have different persistence patterns. In addition, we used the reference strain Scott A. These BFs were treated with chitosan, a natural biopolymer with demonstrated antiBF effectiveness (Costa, Silva, Tavaría, & Pintado, 2013; Martínez et al., 2010; B. Orgaz, Puga, Martínez-Suárez, & SanJose, 2013; Belen Orgaz, Lobete, Puga, & Jose, 2011). Moreover, we wanted to determine if the ability of *Lm* to recover from chitosan action was also affected by the presence of *Pf* and the T. To this end, we calculated the *Recovery Rate* of *Lm* cells along a 48 h revitalization period. Changes in live/dead subpopulations and BF structure were also analysed over this period by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

3 Materials and Methods

3.1 Bacterial strains

Pseudomonas fluorescens ATCC 948TM (*Pf*) and three *Listeria monocytogenes* (*Lm*) strains, the reference strain *Lm* Scott A (serotype 4b, lineage I), and two environmental strains, *Lm* 10p and *Lm* 6np isolated from an Iberian pig slaughterhouse and processing plant by Ortiz et al., (2010), were used as BF former organisms. *Lm* environmental isolates were identified and characterized by serotyping and PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) by the same authors. *Lm* 10p was one of the strains classified as persistent as it had been repeatedly sampled over a large time span (from 1 to 3 years), while 6np was in the non-persistent group. They were all stored at -20°C in Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid) with 15% glycerol. For preinocula, overnight cultures were incubated under shaking (80 rpm) at 20°C in TSB to attain the mid exponential phase. Cells were harvested by centrifugation at 4000 × g for 10 min, washed twice in sterile TSB and their OD₆₀₀ was adjusted to obtain 10³ CFU mL⁻¹ inocula, both in monospecies and in dual-species cultures.

3.2 Experimental system

BFs were developed on single-use 22 × 22 mm thin, borosilicate commercial microscope glass coverslips, as described in Orgaz et al., (2011). Sixteen coverslips were held vertically by marginal insertion into the narrow radial slits of a Teflon carousel platform (6.6 cm diameter). The platform and its lid were assembled by an axial metallic rod for handling and placed into a 600 mL beaker. The whole system, *i.e.*, coverslips, carousel and the covered 600 mL beaker were heat-sterilized as a unit before aseptically introducing 60 mL of inoculated TSB. For dual-species BFs containing *Pf* and one of the three *Lm* strains that were aforementioned, both bacteria were inoculated at the same level (1:1); *Lm* monospecies BFs were used as controls. Incubation was carried out at 20°C/48 h (*warm* BF) and 4°C/20 days (*cold* BF) in a rotating shaker at 80 rpm. Under these conditions, BF growth occupied approximately 70% of the coverslip's surface.

3.3 Antimicrobial testing

Chitosan with a degree of deacetylation of 75–85% and a molecular weight ranging from 190,000 to 300,000 Da was purchased from Sigma Aldrich. For BF assays, a 1% (w/v) chitosan solution was prepared in 1% (v/v) acetic acid. For BF treatment, the coverslips were aseptically extracted from the carousel platform with sterile tweezers and dipped in sterile NaCl (0.9% w/v) to eliminate weakly attached cells. Next, the samples were individually immersed into Falcon test tubes containing 15 mL of the sterile chitosan cleaning solution for 1 h at 20°C followed by a washing step with saline before recovery and counting.

3.4 Cell recovery and counting

For cell recovery and counting of residual BF dwelling cells, attached cells were removed by swabbing both coverslip faces. Cells were later transferred into a 1.5 mL of peptone water tubes that were vigorously stirred in a vortex to break up cell aggregates, diluted in peptone water and pour-plated on general and selective media, Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid) and PALCAM Agar Base (Oxoid) for *Lm* counts. Colonies were counted after 48 h incubation at 37°C. Untreated control samples were processed identically for cell recovery and counting. Chitosan efficiency was expressed as the log reduction of *Lm* attached cells. All cultures were run in triplicate on different days and two coverslips were taken from a carousel for each result. Data thus correspond to the average of six samples.

3.5 Biofilm recovery

To determine the potential recovery of *Lm* attached cells exposed to chitosan, treated *warm* and *cold* BF coverslips were individually and aseptically placed into sterile Falcon test tubes containing 15 mL of fresh sterile TSB and incubated at 20°C while shaking. Sampling was carried out after 5, 16, 24 and 48 h. *Recovery Rates* are here defined as the reverse of the *apparent* generation times of the attached counts over the revitalization period. *Apparent* here means that a combination of overall proliferation and a potentially changing balance of attached minus detached cells is integrated in each result of viable attached cells. For calculations we used the following equations:

$$\mu = (\text{Log } N_2 - \text{Log } N_1) / (t_2 - t_1)$$

$$g = \log 2 / \mu$$

with N_2 as the attached cell density at the end of the exponential growth phase; N_1 as the attached cell density at the beginning of the exponential growth phase; t_2 and t_1 were the length of time to attain N_2 and N_1 , respectively.

3.6 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Images of dual-species BFs after chitosan treatment and over the revitalization period were evaluated by CLSM using a FLUOVIEW® FV 1200 Laser Scanning Confocal Microscope (Olympus). For CLSM observation, BFs developed on glass coverslips were rinsed with sterile 0.9% NaCl and stained with a LIVE/DEAD® biofilm viability kit (L10316, Life Technologies), including Syto 9, which labels all bacteria with intact membranes. Those with damaged membranes were stained with propidium iodide, which only penetrates cells with damaged membranes. Thus, for image analysis, green corresponds to live cells and red corresponds to dead or damaged cells. For calculations, the total area of the coupon was scanned with a 10X objective to select three representative areas. Then, CLSM images of 0.12 x 0.12 mm were examined with an oil immersion objective lens at 60X. Three-dimensional projections (Maximum Intensity Projection, MIP) were reconstructed from z-stacks using IMARIS® 7.6 software (Bitplane AG, Zürich, Switzerland). To calculate biovolume figures using the MeasurementPro module of the above mentioned software, the whole image was segmented into channels that were analysed to obtain the total volume occupied by cells (that is, green cells plus red cells).

3.7 Statistical analysis

At least three independent experiments were performed and two coupons were sampled each time (n=6). Data were analysed using Statgraphics Centurion software (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md., USA). ONE-way ANOVA analysis of variance was carried out to determine if samples were significantly different at a 95.0% confidence level ($p < 0.05$).

4 Results

4.1 Effect of the presence of *P. fluorescens* and the temperature of biofilm formation in *L. monocytogenes* tolerance to chitosan treatment

Table 1 shows results corresponding to *Lm* counts in mono and dual-species BF with *Pf* formed at two different temperatures (4°C and 20°C). *Lm* counts attained similar figures in monospecies BF at the end of the cultivation independent of the temperature and the *Lm* strain. When dual-species BFs were developed at 20°C, the three tested *Lm* strains yield higher counts than in their monospecies BFs (on average, $1.5 \log \cdot \text{cm}^{-2}$ greater). In contrast, when the same dual-species BFs were cultivated at 4°C, we did not found significant differences in *Lm* counts whether in mono or dual-species BFs.

Figure 1 shows the effectiveness of chitosan as an antiBF compound expressed as *Lm* cell reduction, in mono and dual-species BFs with *Pf*. The presence of *Pf* increased *Lm* tolerance to chitosan independently of the cultivation temperature, but the persistent-strain 10p was equally tolerant when in monospecies and much more tolerant when these

were developed at 4°C (just 1 log reduction in *cold* BF (4°C) vs. more than 3 log reduction in *warm* BF (20°C)). Moreover, we noted that although in dual-species *warm* BF *Lm* counts reached higher levels than in *cold* ones (Table 1), this was not translated into a greater tolerance to chitosan (on average, 2 log vs 3 log reduction in *cold* and *warm* BFs, respectively) (Fig. 1).

4.2 Effect of the presence of *P. fluorescens* and the temperature of biofilm formation in *L. monocytogenes* recovery after chitosan exposure

Further, we wanted to see the effect of the presence of *Pf* and the T of cultivation on *Lm* ability to recover after chitosan exposure. For this, *warm* and *cold* treated BFs were grown in fresh TSB at 20°C for a 48 h period. Counts were made along this period to calculate the *Recovery Rate* of *Lm* adhered cells. The results corresponding to *warm* and *cold* BFs are shown in Tables 2 and 3, respectively.

In general, after 24 h revitalization, all the tested strains reached the initial population level both in *warm* and *cold* BFs, and were faster in the presence of *Pf*. Indeed, the RR was significantly higher in dual-species BF in comparison with monospecies BF (on average, 0.43 ± 0.03 vs. 0.33 ± 0.02). Additionally, *Lm* cells from *warm* BFs recovered faster than those from *cold* BFs (0.42 ± 0.02 vs. 0.35 ± 0.02). Moreover, persistence seemed to be related to the *Lm* recovery speed. Whereas strain 10p recovered at almost the same pace with or without *Pf*, the presence of this secondary species was crucial for *Lm* 6np recovery, especially in *cold* BF. Indeed, in *cold* monospecies *Lm* 6np BFs, we did not observe plate growth up to more than 24 h while in the presence of *Pf*, *Lm* counts reached 3 log after 5 h of revitalization (Table 3).

4.3 Structural changes of *warm* and *cold* dual *L. monocytogenes*/*P. fluorescens* biofilms after chitosan treatment

Lm strain 10p was selected for further studies as it turned out to be specifically unaffected by neither the presence of *Pf* nor the temperature of BF formation. CLSM images of structural changes after chitosan treatment and over the revitalization period in their *warm* and *cold* BFs are displayed in Figure 2. *Warm* BFs were much thicker than their corresponding *cold* ones (75 μm vs. 39 μm , respectively), and most of the cells appeared green. After chitosan treatment, the biovolume occupied by live cells (in green) was drastically reduced in either type of BF, appearing mostly in cells that were severely damaged or dead (in red). Structural injuries were nevertheless more intense in *warm* BF, as shown in detail in Figure 3 (extended section views of control and treated BFs). Whereas in *cold* BF the original structure was mostly unaffected (Fig. 3B,D), in *warm* BF, the landscape we had previously observed in control samples was utterly dismantled due to the formation of large cavities/hollow in which cells were unseen (Fig. 3A,C).

CLSM images of *warm* and *cold* *Lm*/*Pf* BFs at different steps over the revitalization period were displayed in Figure 2. We noted that the biovolume occupied by the live subpopulation (green) increased over time in both systems (*warm* and *cold* BF). This shift

in biovolume population was faster in *warm* BF at the beginning of the revitalization period (from 0.1 to 46.1% in *warm* BFs vs. from 14.2 to 24.7% in *cold* BFs), although in *cold* BFs the outcome of the live cell subpopulation was higher after 24 h of revitalization (62% vs. 46% in *cold* and *warm* BFs, respectively). CLSM images of extended sections views of *warm* *Lm* 10p/*Pf* BFs taken at different stages of the revitalization period (Fig. 4) showed the existence of dispersed nuclei in green (live cells) surrounded by cellular debris (in red). After 48 h of revitalization, these green areas practically covered the bottom layers of the BFs (Fig. 4C).

5 Discussion

5.1 *L. monocytogenes* tolerance to chitosan exposure in biofilms obtained under different conditions

For this work, two *Lm* strains having different persistence patterns were selected among a collection of *Lm* divided into two categories, depending on the ability to persist on food facilities (Ortiz et al., 2010). Moreover, we used the strain Scott A as a reference. To see how different variables might influence *Lm* tolerance to chitosan in dual-species BFs, we developed two types of BFs, both of them having *Pf* as an *Lm* partner. The first, herein called *warm* BF, was developed at 20°C and the second, *cold* BF, was developed at 4°C during 48 h and 20 days, respectively. We selected these culture conditions because at this time of incubation *Lm* counts were similar in monospecies BFs (Table 1).

Several authors have noted that in mixed BF, both a higher cell density and higher amounts of extracellular polymeric substances (EPS) may account for enhanced cell tolerance to antimicrobials (Behnke, Parker, Woodall, & Camper, 2011; van der Veen & Abee, 2011). Nevertheless, none of these effects can explain our *cold* BF recalcitrance. Indeed, we noted that although dual-species *warm* BF *Lm* counts reached higher levels than in *cold* BFs, this was not translated into a greater tolerance to chitosan (Fig. 1). Moreover, in a previous work we observed that in dual *Pf/Lm* BFs, biomass values (cell + matrix) changed in a T dependent manner. In BF developed at 4°C, biomass values were much lower than in those developed at 20°C (Puga, SanJose, & Orgaz, 2014). As cell population levels were rather similar at both temperatures, we attributed this effect to EPS lessening. Additionally, Lourenço et al., (2011) found that *Lm* mono and dual-species BFs produced at 12°C were generally less susceptible to disinfectants than those produced at 37°C, despite the fact that the cell population was similar in both conditions. Under environmental stresses, including incubation at low temperatures and starvation, a small fraction of actively growing cells of various bacteria may enter into a dormant (non-dividing) state (Lewis, 2007). In this state, cells are more tolerant to antimicrobials as they do not grow; however, they do not die (Keren, Shah, Spoering, Kaldalu, & Lewis, 2004). As a matter of fact, 4°C is a very hostile temperature for cultivation but very common in food processing plants. It is probable that, at this temperature, the population of BF dormant cells would be higher and thus less affected by chitosan treatment.

Similarly, an increase in persisters population was reported by Wu, Vulić, Keren, & Lewis, (2012) when cells were under oxidative stress.

Moreover, we observed that persistent-strain *Lm* 10p behaved differently than the others. Whereas the presence of *Pf* was irrelevant for this strain, growth at low temperatures enhanced its tolerance to chitosan (Fig. 1). This persistent-strain was isolated from an Iberian pig slaughterhouse in a 3-year surveillance study (Ortiz et al., 2010). In food facilities, much of the locations are maintained at low T for food safety reasons, promoting persistence of strains that quickly adapt when a temperature downshift occurs. The mechanisms of *Lm* that allow the facilitation of growth at low temperatures have been extensively reviewed (Beales, 2004; Chan & Wiedmann, 2009; Tasara & Stephan, 2006). Cabrita et al., (2015) recently found differences in the gene expression levels among persistent and sporadic strains of *Lm*. The persistent-strains showed significantly higher transcript levels of sigB, which is involved in the tolerance to low temperature and to osmotic stress. In addition, Ochiai et al., (2014) suggested that persistent-strains alter their BF-forming ability in a T dependent manner. The fact that the persistent-strain *Lm* 10p was more tolerant to chitosan than the others, and even much more in *cold* BFs, strengthens the relationship between better adaption at stressful conditions and persistence in food environments.

5.2 *L. monocytogenes* recovery ability after chitosan exposure in biofilms obtained under different conditions

Having observed that both the temperature of BF development and the presence of *Pf* affected *Lm* tolerance to chitosan, we wanted to determine if its ability to recover from this compound was also modified by these two variables. In a previous work, we demonstrated that monospecies BFs of *Lm* persistent-strains developed at 20°C were able to recover faster than those of sporadic BFs from chitosan action (B. Orgaz et al., 2013), suggesting more efficient repair mechanisms in the first BFs. Here, we observed that the presence of *Pf* modified the recovery rate of *Lm* Scott A and that of the non persistent-strain *Lm* 6np, especially when BFs were obtained under low temperatures (Table 3). On the contrary, for *Lm* 10p, the presence of *Pf* was again irrelevant. This suggests that persistence could not be just a matter of intrinsic strain features, but a balance between intrinsic and extrinsic factors, such as the presence of a secondary species. Whereas persistent-strain intrinsic factors might outweigh extrinsic factors, for sporadic strains the latter could be crucial for their survival and persistence in food environments.

5.3 Structural changes after chitosan treatment and over recovery time of warm and cold *L. monocytogenes* 10p/*P. fluorescens* biofilms

After treatment, dual *Lm* 10p/*Pf* warm BF were much more damaged by chitosan than *cold* BFs, despite that the latter were much thinner (Fig. 2) and the *Lm* cell density was higher in *warm* BF (Table 1). This suggests that other features apart from these account for the observed differences between *warm* and *cold* BF injuries.

The antimicrobial properties of chitosan are mostly due to its ability to interact with the negatively charged components of the cell membrane (Friedman & Juneja, 2010). Once the membrane is damaged, chitosan may enter the cell and interact with DNA (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010). In recent years, there have been many studies showing that extracellular DNA (eDNA) is an important component of the BF matrix coming from cell lysis and active release mechanisms in response to quorum sensing signals (Jakubovics, Shields, Rajarajan, & Burgess, 2013; Okshevsky, Regina, & Meyer, 2015). Indeed, in the case of *Lm*, eDNA seems to play a pivotal role in the adhesion and maintenance of BF structure (Harmsen, Lappann, Knøchel, & Molin, 2010). Recently, Guilbaud, Piveteau, Desvaux, Brisse, & Briandet, (2015) have shown that among 96 *Lm* isolates from different origins, the honeycomb-like morphotype was dominant. In this morphotype, they observed the presence of hollow voids in which eDNA from cell lysis accumulated.

The structural damage we have observed in *warm Lm/Pf* BF could be due to the formation of DNA-chitosan neutral complexes. If this occurred, this interaction likely destabilizes the BF structure. Weakening of BF structure by eDNA removal has already been described with DNases as a pre-treatment that increases antimicrobial susceptibility (Kaplan et al., 2012). At this point, the specific junctions that stabilize the matrix of dual-species *Pf/Lm* BF are still unknown, but certain interactions between eDNA, proteins and polysaccharides are likely to occur (Das, Sehar, & Manefield, 2013). The fact that in *cold* BFs we do not observe this type of structural damage suggests under *cold* stress conditions the proportion of structural components present in the matrix change or that the type of junctions that are maintaining the structure are somehow different.

5.4 Changes in volumes occupied by live/dead cells along the revitalization period in *warm* and *cold L. monocytogenes* 10p/*P. fluorescens* biofilms

Interestingly, we also found differences between *warm* and *cold* BF in cell population changes (live/dead or damaged) along the revitalization period (Fig. 2). During this period, various phenomena probably occur simultaneously. First, once the environmental conditions change, dormant cells are capable of being resuscitated, generating what Lennon & Jones, (2011) referred to as a “seed bank”. Second, some of the damaged cells that here appeared in red (as propidium iodide may enter the membranes of those cells whether damaged or dead), would have overcome their damage and thus starting growing at a normal pace; third, the active growth of surviving cells may account for this difference.

Our results suggest that the contribution of these mechanisms could nevertheless differ in *warm* and *cold* BFs. As previously noted, in *warm* BFs the biovolume of live cells increased drastically during the first 5 h of revitalization, suggesting that most of the cells that appeared in red were actually just damaged and not dead. Moreover, we observed the nuclei of live cells (probably surviving cells) (Fig. 4) that could have served as repopulation starting points. Indeed, after 48 h of revitalization (Fig. 4C), green areas were predominantly located at the bottom of the BF structure, underlying the role of these

survival cells in BF expansion. In *cold* BFs developed under stress conditions, the contribution of the first mechanism would have likely prevailed over the others. Although the generation of persister cells in multispecies BFs has been little investigated, it is well known that they emerge under stressful situations (Lewis, 2010; Wang & Wood, 2011). This could explain why at the beginning of the revitalization period these cells need more time for adaption, but higher population levels were accounted for at the end of this period.

In conclusion, *cold* BFs were more tolerant to chitosan than *warm* BFs, although they were thinner and had a lower cell density. Moreover, chitosan injuries and the recovery pattern of *Lm* cells inside these BFs were also different. For *Lm* persistent-strains, the presence of *Pf* was irrelevant and growth at low temperatures seemed to enhance tolerance to chitosan. On the contrary, for the *Lm* non persistent-strain, the presence of *Pf* was crucial for this matter, highlighting that persistent-strains adapt better at low temperatures. Our data suggest that in BFs developed under refrigeration temperatures, structural changes together with cell dormancy might lead to a higher tolerance toward antimicrobials. These findings underline the importance of the evaluation of antimicrobial tolerance in BFs developed at refrigeration temperature to design realistic antiBF strategies in the food industry where most of the products are processed at low temperatures.

6 Acknowledgments

The authors specially thank Dr. JV. Martinez-Suarez for generously providing the environmental strains of *Lm*, the Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre of the University Complutense of Madrid for its skilful assistance and the Spanish Ministry of Economy and Competition for funding project AGL2010-22212-C02-01.

7 Tables and figures

Table 1. *Lm* attached cells in mono and dual-species biofilms (with *Pf*), developed at 48h/20°C (*warm*) and 20d/4°C (*cold*) (n=6).

Biofilm type		Control	
		Monospecies BF	Dual-species BF
		(Log ₁₀ CFU·cm ⁻²)	(Log ₁₀ CFU·cm ⁻²)
		X ± SD	X ± SD
<i>Warm</i> biofilms	Scott A	6.2 ± 0.4	7.9 ± 0.3*
	10p	5.9 ± 0.2	7.6 ± 0.1*
	6np	5.8 ± 0.2	6.9 ± 0.4*
<i>Cold</i> biofilms	Scott A	5.4 ± 0.4	5.6 ± 0.4
	10p	5.7 ± 0.4	5.5 ± 0.2
	6np	6.0 ± 0.2	5.4 ± 0.4

* Results showing statistically significant differences ($p < 0.05$) between monospecies and dual-species BF

Table 2. Attached *Lm* population (Log₁₀ CFU·cm⁻²) in mono and dual-species *warm* biofilms (20°C) over 48 h revitalization period after chitosan exposure and calculated recovery rate (h⁻¹). Counts are represented as a mean ± SD (n=6). In columns, different superscripts mean statistically significant differences ($p < 0.05$).

Biofilm type		Revitalization time (h)				Recovery Rate (h ⁻¹)
		5	16	24	48	
<i>Warm</i> biofilms	Scott A	3.8 ± 0.5 ^c	5.5 ± 0.4 ^c	6.1 ± 0.5 ^c	6.5 ± 0.8 ^b	0.3 ± 0.1 ^b
	10p	3.1 ± 0.5 ^d	5.2 ± 0.5 ^d	5.6 ± 0.2 ^c	6.5 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.0 ^{a,b}
	6np	2.3 ± 0.7 ^e	3.5 ± 0.4 ^e	3.8 ± 0.8 ^d	6.4 ± 0.7 ^b	0.3 ± 0.0 ^b
	Scott A+ <i>Pf</i>	6.1 ± 0.4 ^a	7.7 ± 0.1 ^a	8.3 ± 0.3 ^a	8.3 ± 0.3 ^a	0.4 ± 0.1 ^b
	10p+ <i>Pf</i>	4.7 ± 0.9 ^b	6.5 ± 0.4 ^b	7.3 ± 0.7 ^b	8.3 ± 0.5 ^a	0.5 ± 0.1 ^{a,b}
	6np+ <i>Pf</i>	4.1 ± 0.3 ^{b,c}	6.5 ± 0.3 ^b	7.1 ± 0.5 ^b	8.2 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^a

Table 3. Attached *Lm* population ($\text{Log}_{10} \text{CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$) in mono and dual-species *cold* biofilms (4°C) over 48 h revitalization period after chitosan exposure and calculated recovery rate (h^{-1}). Counts are represented as a mean \pm SD ($n=6$). In columns, different superscripts mean statistically significant differences ($p<0.05$).

Biofilm type		Revitalization time (h)				Recovery Rate (h^{-1})
		5	16	24	48	
<i>Cold biofilms</i>	Scott A	3.0 ± 0.5^b	4.0 ± 0.6^b	5.2 ± 0.5^c	7.4 ± 0.5^a	0.3 ± 0.1^b
	10p	3.9 ± 0.5^a	5.0 ± 0.6^a	$5.4 \pm 0.5^{b,c}$	7.0 ± 0.5^b	0.3 ± 0.1^b
	6np	*	*	*	6.2 ± 0.3^d	*
	Scott A+ <i>Pf</i>	3.8 ± 0.4^a	5.3 ± 0.4^a	6.8 ± 0.2^a	6.6 ± 0.2^c	0.5 ± 0.0^a
	10p+ <i>Pf</i>	$3.0 \pm 0.7^{b,c}$	4.9 ± 0.6^a	5.9 ± 0.5^b	$7.1 \pm 0.4^{a,b}$	0.3 ± 0.0^b
	6np+ <i>Pf</i>	2.5 ± 0.3^c	5.2 ± 0.6^a	5.9 ± 0.7^b	7.5 ± 0.3^a	0.4 ± 0.0^b

* Below detection limit ($31 \text{CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$)

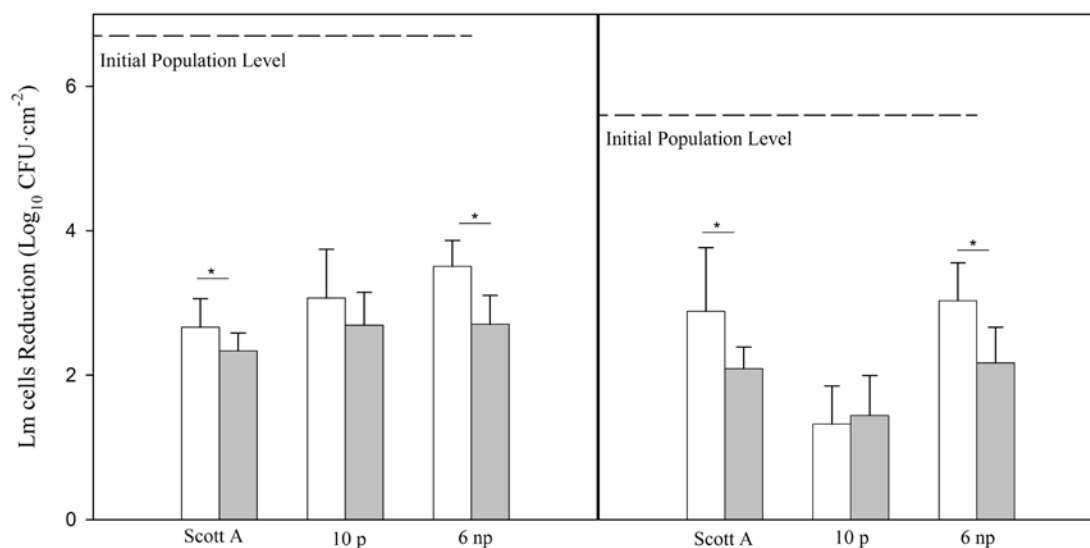


Figure 1. Log reduction of *L. monocytogenes* viable cells in monospecies (white bars) and dual-species biofilms (BFs) with *P. fluorescens* (grey bars) after 1 h-1% chitosan immersion. (A): *warm* BF and (B): *cold* BF. Data with asterisks were significantly different ($p < 0.05$) ($n=6$).

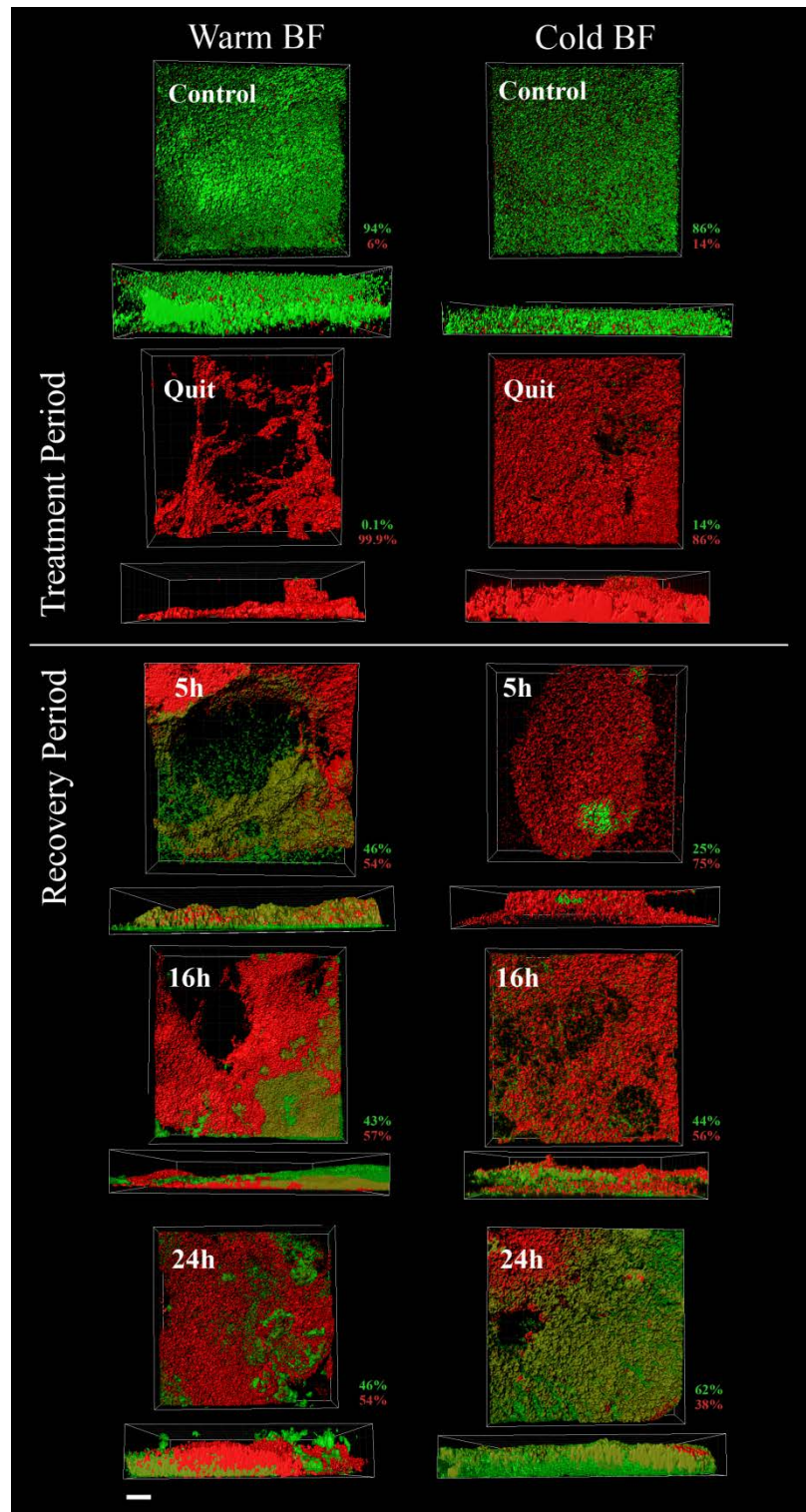


Figure 2. CLSM images of 3D-reconstructed zenital views and x - y planes of *L. monocytogenes* 10p/*P. fluorescens* biofilms (BFs). On the left *warm* BF and on the right *cold* BF. Top images correspond to BF before and after 1% chitosan exposure. Bottom images correspond to different stages over the revitalization period. Samples were stained with a Live-Dead Kit (*i.e.*, live cells in green; damaged or dead cells, in red). The % of biovolume occupied by live (green) and dead or damaged (red) populations are in the lower right-hand side of each image. (Scale bar = 30 μ m).

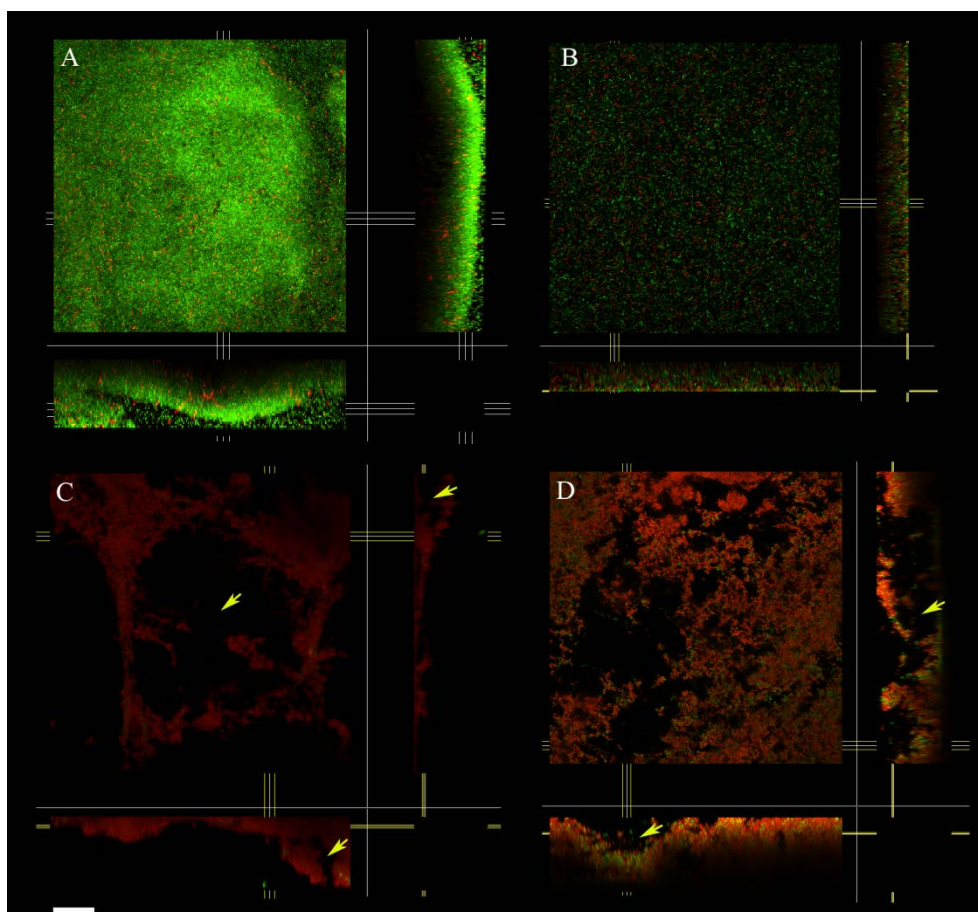


Figure 3. CLSM images of extended section views (z - y and z - x planes) of *L. monocytogenes* 10p/*P. fluorescens* biofilms (BFs). On the left are those corresponding to *warm* BFs and on the right are those of *cold* BFs. (A and B): control; (C and D): after 1 h chitosan exposure. Samples were stained with a Live-Dead Kit (*i.e.*, live cells in green; damaged or dead cells, in red). Yellow arrows indicate structural damage (cavities) in the BF structure. (Scale bar = 30 μ m).

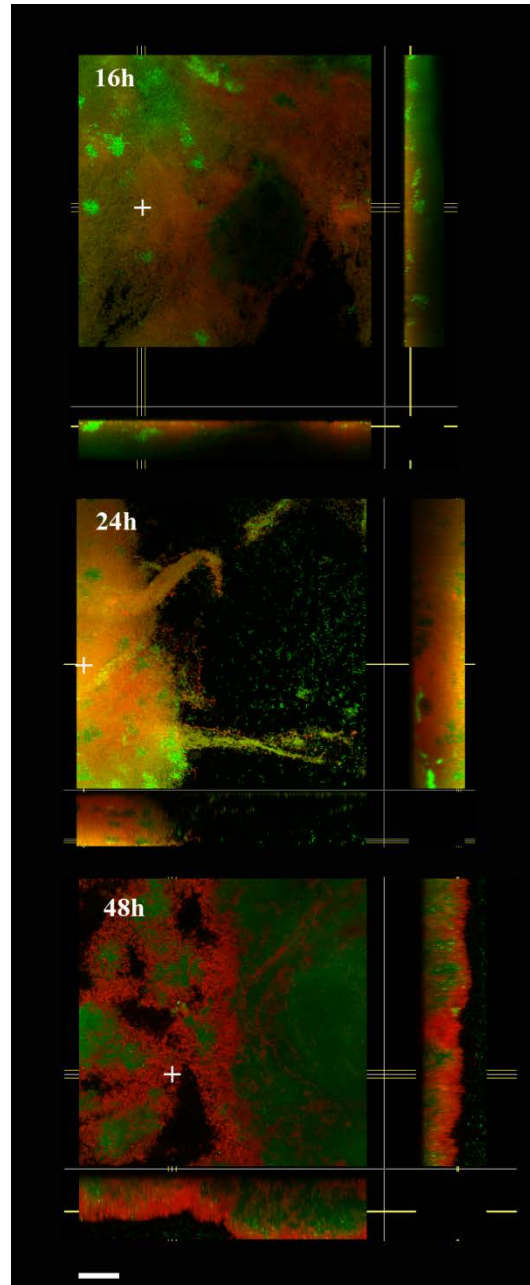


Figure 4. CLSM images of extended section views (z - y and z - x planes) of *L. monocytogenes* 10p/*P. fluorescens* warm biofilms (BFs) taken at different steps along the revitalization period. Samples were stained with a Live-Dead Kit (*i.e.*, live cells in green; damaged or dead cells, in red) (Scale bar = 30 μ m).

8 References

- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1–20. <http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D., & Camper, A. K. (2011). Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.05514-11>
- Bergholz, T. M., Bowen, B., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2602–12. <http://doi.org/10.1128/AEM.07658-11>
- Cabrita, P., Trigo, M. J., Ferreira, R. B., & Brito, L. (2015). Differences in the Expression of Cold Stress–Related Genes and in the Swarming Motility Among Persistent and Sporadic Strains of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(7), 150514115601005. <http://doi.org/10.1089/fpd.2014.1918>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Chan, Y. C., & Wiedmann, M. (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 237–253. <http://doi.org/10.1080/10408390701856272>
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.05.006>
- Costa, E. M., Silva, S., Tavaría, F. K., & Pintado, M. M. (2013). Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*, 20, 27–31. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.002>
- Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 778–86. <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–93.

- EFSA. Trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne (2015). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 990–1004. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737–1761.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., & Nychas, G. J. (2013). Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLoS ONE*, 8(10), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(August), 1–26. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., & Briandet, R. (2015). Exploring the Diversity of *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819. <http://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., & Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2271–2279. <http://doi.org/10.1128/AEM.02361-09>
- Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2014). The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 990–1011. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12087>
- Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., & Burgess, J. G. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 57(6), 467–75. <http://doi.org/10.1111/lam.12134>
- Kaplan, J. B., LoVetri, K., Cardona, S. T., Madhyastha, S., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., & Izano, E. A. (2012). Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *The Journal of Antibiotics*, 65(2), 73–7. <http://doi.org/10.1038/ja.2011.113>
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K. (2004). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. <http://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>

- Keto-Timonen, R., Tolvanen, R., Lundén, J., & Korkeala, H. (2007). An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1866–73.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G. J., & Giaouris, E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.07099-11>
- Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews. Microbiology*. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(1), 48–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–72. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Lourenço, A., Machado, H., & Brito, L. (2011). Biofilms of *Listeria monocytogenes* Produced at 12 ° C either in Pure Culture or in Co-Culture with *Pseudomonas aeruginosa* Showed Reduced Susceptibility to Sanitizers. *Journal of Food Science*, 76(2), 142–148. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02011.x>
- Martinez, L. R., Mihi, M. R., Han, G., Frases, S., Cordero, R. J. B., Casadevall, A., Nosanchuk, J. D. (2010). The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials*, 31(4), 669–679. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.087>
- Ochiai, Y., Yamada, F., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., & Ueda, F. (2014). Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection*, 77(1), 133–40. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-074>
- Okshevsky, M., Regina, V. R., & Meyer, R. L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73–80. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.002>
- Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., & Jose, C. S. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 817–828. <http://doi.org/10.3390/ijms12010817>

- Orgaz, B., Puga, C. H., Martínez-Suárez, J. V., & SanJose, C. (2013). Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control*, 32(2), 484–489. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.024>
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. N. V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10), 1177–84. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0535>
- Puga, C., SanJose, C., & Orgaz, B. (2014). Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms. In E. C. Hambrick (Ed.), *In Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies* (pp. 115–131). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43(1), 229–37. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.010>
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Tasara, T., & Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1473–1484.
- Valderrama, W. B., & Cutter, C. N. (2013). An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 801–17. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.561378>
- Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 421–31. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.029>
- Wang, X., & Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.05068-11>
- Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., & Lewis, K. (2012). Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <http://doi.org/10.1128/AAC.00921-12>

DISCUSIÓN INTEGRADORA

1 SIMULACIÓN DE LOS BIOFILMS PORTADORES DE *Listeria monocytogenes* EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.1 EL PLANTEAMIENTO

Los trabajos que acompañan a esta tesis, han tratado de simular varios aspectos importantes del escenario en el que puede encontrarse una bacteria como *Lm* en instalaciones de la industria alimentaria. Como sistema modelo se empleó un procedimiento en *batch* con un sustrato de vidrio semisumergido como superficie de adhesión. La elección de este sistema semisumergido pretende una síntesis de distintas condiciones que pueden darse en la industria alimentaria, al integrar diferentes intensidades de aireación y fuerzas de cizalla líquida en un mismo cupón: la parte inferior, totalmente inmersa (*Fully Immersed*, FI) y la intermedia, localizada en la interfase líquido-aire (*Air-Liquid Interphase*, ALI), muy bien aireada (II-Fig. 3). Esta última situación se da con frecuencia en la industria alimentaria tanto en tuberías como en superficies abiertas, particularmente en tanques y depósitos. Se combinan pues en los resultados, los recuentos de viables que integran BF fisiológicamente heterogéneos presentes en superficies relativamente grandes, con métodos de cuantificación por análisis de imagen de CLSM, empleando distintos fluorocromos para el marcaje celular, correspondientes a campos más pequeños, no integrados. Las 2 técnicas dan visiones complementarias.

Para estudiar el efecto que una bacteria acompañante pudiera tener sobre la capacidad de *Lm* para formar BF, se eligió una cepa de origen alimentario de *Pf*, bacteria ubicua no solo en alimentos, sino también en suelos y agua, y además buena productora de BF (Huis in 't Veld, 1996; Liao y Blackburn, 2006; López-Gálvez y col., 2010), comparándose las características de los BF de una y 2 especies.

Dado que uno de los aspectos que más preocupa de la contaminación de alimentos con *Lm* es la existencia de algunas cepas que consiguen instalarse de forma muy prolongada en equipos e instalaciones (Lundén y col., 2003; Miettinen y col., 1999; Norton y col., 2001), se compararon 9 cepas, persistentes y no persistentes de *Lm*, aisladas de industrias cárnicas por Ortiz y col. (2010) y la cepa de referencia Scott A en cuanto a la formación de BF mixtos con *Pf*.

Como en la industria alimentaria el uso de las bajas temperaturas para minimizar la proliferación microbiana es muy generalizado, los cultivos se desarrollaron siempre a 2 temperaturas de manera paralela, 20° y 4°C (aquí, templados y fríos), simulando la temperatura ambiente y la de refrigeración, para comprobar si los BF formados en frío tienen alguna característica diferencial.

Para terminar, se han estudiado algunos aspectos del envejecimiento de BF, dado que en la industria alimentaria, los BF envejecidos pueden ser el origen de contaminaciones tenaces, que no se resuelven con los programas de limpieza y desinfección habituales.

1.2 CEPAS Y PERSISTENCIA

Es bien sabido que *Lm* cuenta con eficaces mecanismos de adaptación a diversas situaciones de estrés (Chan y Wiedmann, 2009; Moorhead y Dykes, 2004; Schmid y col., 2009; Tasara y Stephan, 2006) que le permiten sobrevivir y crecer en ambientes relacionados con el procesado y la manipulación de alimentos, además de adherirse y formar BF (Di Bonaventura y col., 2008; Lee y col., 2013; Moltz y Martin, 2005), con el consiguiente peligro de contaminación (Cappitelli y col., 2014; Srey y col., 2013). Pero no todas las cepas de *Lm* responden del mismo modo al estrés por frío o por otras condiciones desfavorables (Valderrama y col., 2014) por razones que pueden estar relacionadas con las distintas matrices de origen de las cepas (Durack y col., 2013; Pieta y col., 2014). A pesar de los factores extrínsecos que puedan estar implicados, una mejor capacidad para adaptarse a las situaciones de estrés podría ser uno de los aspectos clave para que estas cepas sean seleccionadas positivamente en las instalaciones de la industria alimentaria, tras competir con otras, haciendo posible su permanencia a lo largo del tiempo. Según Carpentier y Cerf (2011) sin embargo, cualquier cepa esporádica, si se dan los factores extrínsecos adecuados, podría hacerse persistente en un entorno determinado, que se convertiría en reservorio, comportándose como foco de contaminaciones para toda la instalación.

Por ejemplo, en nuestro caso la cepa no persistente 6np, aunque en cultivo puro y a temperatura ambiente mostró una elevada sensibilidad al quitosano, como veremos más adelante, obtuvo un extenso beneficio de la presencia de *Pf*, en la formación de BF a bajas temperaturas. Algunos de estos factores extrínsecos podrían ser por tanto que una bacteria acompañante compatible le provea de mayor capacidad de adhesión y protección frente a las amenazas del ambiente (Carpentier y Chassaing, 2004) o de adaptación a una determinada situación de estrés (*i.e.* bajas temperaturas) que además le puede proporcionar una protección cruzada frente a otros tipos de estrés (Hill y col., 2002), sin olvidar la trascendencia de la localización en nichos favorables, difíciles de acceder y protegidos de la limpieza y desinfección (Ferreira y col., 2014; Huffman y Butts, 2008).

1.3 BIOFILMS DE UNA Y DOS ESPECIES

Es conocido que *Lm* es capaz de formar BF en cultivos monoespecie (Borucki y col., 2003; Moretro y Langsrud, 2004) y, en contra de lo que se pensaba inicialmente, llegan a alcanzar, aunque bastante lentamente, densidades celulares considerables por cm². Por la relativa lentitud de formación y por la delgadez de los BF de *Lm*, se llegó a creer que

era necesaria la colonización previa o primaria de las superficies con otras bacterias, como las pseudomonas, rápidamente formadoras de BF con matriz abundante. Posteriormente, se ha ido observando que los colonizadores primarios, como *Pf*, pueden tener un efecto positivo, negativo o neutro sobre las cifras de *Lm* en BF, dependiendo sobre todo de la cepa, tamaño de los respectivos inóculos y el orden de acceso de las distintas bacterias a la superficie del sustrato (Carpentier y Cerf, 2011; Mellefont y col., 2008).

En los BF monoespecie de *Lm* aquí desarrollados, no se encontraron diferencias sustanciales entre cepas persistentes y no persistentes en cuanto a la formación de BF y la cepa de referencia mostró un comportamiento similar (I-Fig. 1 y 2; III-Table 2). Otros autores que han evaluado la capacidad de formación de BF en cepas persistentes y esporádicas de esta bacteria, han alcanzado un resultado similar (Harvey y col., 2007; Ochai y col., 2014; Orgaz y col., 2013).

La imagen que ofrecen en nuestro caso estos BF solo de *Lm* (I-Fig. 3) es de células individuales que se distribuyen por la superficie sin aparente desarrollo de microcolonias, como puntuales agregados celulares rodeados de células sueltas. Otros autores que han observado la estructura de los BF desarrollados por *Lm* también han encontrado este patrón, caracterizado por la ausencia de las típicas formaciones de tipo champiñón (Briandet y col., 2008; Guilbaud y col., 2015).

Además, en el caso de la cepa Scott A se contabilizó por densitometría empleando azul de Coomassie como tinción, la biomasa adherida (células+matriz) en los BF puros de *Lm*. A lo largo de la incubación de esos BF de solo *Lm*, y pese a que los recuentos registraban un aumento en el número de células viables adheridas, la biomasa no pareció aumentar significativamente en ningún momento (I-Fig. 2). Las investigaciones sobre la matriz de *Lm* describen una composición muy diferente a la de otras especies. En concreto, la presencia de polisacáridos parece muy limitada. Algunos autores han propuesto que el papel de los polisacáridos estaría sustituido por moléculas como el eDNA, o complejos formados entre este y moléculas como la NAG, formando un polímero de propiedades similares a las de la PNAG, compuesto importante y bien descrito en la matriz de *Staphylococcus* spp. y *E. coli*. (Harmsen y col., 2010). Es posible por tanto que el método aquí utilizado para la cuantificación de matriz no fuera el más adecuado para el tipo de materiales presentes en la matriz de *Lm*.

Para estudiar los BF binarios, aquí se han utilizado varias cepas de *Lm*, con inóculos de tamaño pequeño y comparable al de *Pf*, teniendo ambas especies acceso simultáneo a la superficie. De manera general, la presencia de *Pf* tuvo un efecto positivo sobre la capacidad de *Lm* para formar BF (I-Fig. 1 y 2; III-Tabla 2). En algunos casos, sin embargo, el efecto fue neutro o incluso negativo, en función de la cepa y la temperatura. En concreto, algunas cepas no persistentes mostraron cierto grado de incompatibilidad con

Pf (III-Tabla 2). Esto podría sugerir que uno de los fundamentos de la persistencia para cepas de *Lm*, fuera su grado de compatibilidad o incluso de cooperación, con bacterias que son buenas formadoras de BF como las pseudomonas. Como veremos más adelante al hablar de control, sin embargo, la interacción de ciertas *Lm* con *Pf*, aparte de influir en el número de viables en los BF mixtos resultantes, podría tener otras consecuencias, relacionadas con la resistencia a biocidas.

Es interesante que, para un mismo consorcio, las interacciones ecológicas en BF pueden diferir de las observables entre células planctónicas. Eso se pudo observar aquí (I-Fig.1) con la cepa Scott A, cuyas cifras planctónicas tienden a ser desfavorecidas por la presencia de *Pf* a tiempos largos de incubación, al contrario de lo que ocurre en los BF. Buchanan y Bagi (1999) ya reportaron esa inhibición de las *Lm* planctónicas en presencia de *Pf*. Parece paradójico que se adquiera una relación cooperativa cuando se aumenta la densidad celular, en la que hay más competencia por los mismos nutrientes, pero indudablemente los términos de la relación entre especies cambian cuando se pasa al fenotipo adherido. La mayor proximidad entre células de distintas especies en un mismo BF permite mayor interacción por intercambio de señales de QS (Bamford y col., 2009; Bellenberg y col., 2014; Gantner y col., 2006; McNab y col., 2003). Se ha dicho que la “distancia de la llamada” (*calling distance*) a la que operan estas “conversaciones” en BF es de 3-4 μm (Giaouris y col., 2015). Además en los BF se pueden compartir infraestructuras y servicios, para empezar la propia matriz, pero también otros sistemas de protección, como enzimas extracelulares, además de nutrientes que son subproductos del metabolismo del socio (Jaspe y col., 1995).

¿Cómo se defiende *Lm* de *Pf* en los BF o por qué *Pf* deja ahí de antagonizarla? No podemos de momento dar una respuesta concluyente a esto, pero hemos observado que *Lm* induce cambios (quizás emitiendo la señal de QS universal, AI-2) en la estructura de la matriz producida por *Pf*, haciéndola más compacta (II-Tabla 2). Dados los antecedentes sobre el papel del eDNA en la matriz de *Lm*, así como la importancia de esta molécula en la estabilidad de la matriz, un aumento en este compuesto sería una posible explicación de esa compactación de la estructura. Un mayor contenido de proteínas de tipo amiloide podría también explicar ese efecto (Dueholm y col., 2010; Larsen y col., 2007; Zhou y col., 2012).

La compactación de la matriz podría servir para defender a *Lm* de *Pf*, porque al disminuir presumiblemente la velocidad de difusión, la aísla mejor de cualquier ataque químico, procedente de *Pf*. Además, podría ser una de las razones por las que los BF mixtos son más resistentes a los biocidas (Giaouris y col., 2015; Giaouris y col., 2013; Sanchez-Vizuite y col., 2015; Simões y col., 2009) beneficiando a ambos miembros del consorcio.

De *Lm* se ha dicho que es, desde el punto de vista ecológico, una bacteria “tramposa” (*cheater*) en el sentido de que se aprovecha de los “bienes públicos” (*public goods*) producidos por otros, concretamente de la generosa matriz de *Pf* (Cordero y col., 2012; Drescher y col., 2014). Parece también que el comportamiento de *Lm* en BF corroboraría la llamada Hipótesis de la Reina Negra (Morris, 2015) según la cual algunas especies, para mejorar su adaptación, eliminan de su genoma funciones o vías metabólicas que le suministran sin contrapartida otras bacterias de su entorno con las que han coevolucionado. Algo similar a las adaptaciones que llevan a los endosimbiontes a ser dependientes de su hospedador. Hemos observado, sin embargo, que *Lm* podría ayudar a *Pf* frente al estrés, a base de reforzar o compactar la matriz del BF mixto, lo que supondría pasar de una situación de comensalismo a otra de cooperación.

La aportación de *Pf* a la convivencia con *Lm* en BF podría, por otra parte, no ser pasiva. Las EPS producidas por *Pf* en las primeras fases de adhesión, podrían favorecer la llegada y la adhesión de células de *Lm* al sustrato. Algo de esto tiene lugar a través del Pls o el eDNA en BF de *P. aeruginosa* (Gloag y col., 2013; Irie y col., 2012; Zhao y col., 2013). Así, *Lm* lograría una adhesión más rápida o de un mayor número de células, ganando ventaja frente a un cultivo creciendo en monoespecie.

Otro posible mecanismo de cooperación tiene relación con la estructura desarrollada en estos BF. En el capítulo I y para observar con CLSM el efecto de *Pf* en la estructura de los BF con *Lm*, se emplearon tinciones que permitían diferenciar células Gram positivas y Gram negativas. Así, se pudo ver que la distribución espacial de las poblaciones en la estructura de los BF mixtos, parecía responder a un patrón determinado. *Lm* aparecía en las capas más profundas, cercanas al sustrato y cubiertas por repetidas capas de *Pf* (I-Fig. 4, 5 y 6), lo que se puede atribuir a una mayor capacidad de *Lm* para la vida en anaerobiosis (Lungu y col., 2009; Lungu y col., 2010), aparte de conferirle un mayor grado de protección. Quizá, en las capas profundas *Lm* esté resguardada de los fenómenos pasivos de dispersión ocasionados por las fuerzas de cizalla del líquido en contacto (Choi y Morgenroth, 2003; Picioreanu y col., 2001), o pueda tener acceso a nutrientes procedentes de la lisis de células enterradas de *Pf* (Trevors y col., 2011) que no consigan mantenerse viables en esas condiciones. El patrón espacial de estratificación ha sido aquí observado, con independencia de la temperatura, en los BF formados por *Lm* Scott A y *Pf*, así como en los mixtos desarrollados a 4°C por algunas de las cepas persistentes de *Lm*. En otras cepas, la estratificación no fue tan evidente, lo que indica que la interacción es específica de cada cepa, sin guardar, tampoco en este caso, relación con el serotipo o el linaje. Otros autores han encontrado estructuras estratificadas en otros BF multiespecie (Almeida y col., 2011; Bridier y col., 2012).

Es curioso que *Lm* llegue a ocupar esa posición debajo de *Pf*, a pesar de que crece y se adhiere de manera más lenta (I-Fig. 2). Es posible pues que *Lm* tenga alguna manera

de construirse ese nicho: otro aspecto de la interacción *Lm*/*Pf* que cuestiona la pasividad inicialmente asumida. Aún no se conoce el mecanismo por el que se produce. Houry y col. (2012), observaron mediante CLSM a tiempo real cómo células de una cepa de *Bacillus thuringiensis* procedentes de fase planctónica, formaban túneles por los que atravesaban un BF preformado de la misma cepa. Este movimiento podría estar asociado a la capacidad de *Lm* para producir enzimas como la quitinasa descrita por Tirumalai y Prakash (2011), que podría abrir paso a través de la matriz de *Pf*. Es posible por otra parte, que la matriz de *Lm*, menos contundente pero más adhesiva por su riqueza en proteínas y eADN que la de *Pf* (Combrouse y col., 2013; Harmsen y col., 2010), consiga una fijación más tenaz al sustrato que el conseguido por *Pf* (Schluter y col., 2014), empujando quizás hacia arriba a las nuevas células de *Pf*, que tienden a ubicarse en la superficie buscando un mayor acceso a nutrientes y oxígeno (Kim y col., 2014). En cualquier caso, la interacción de las 2 especies, independientemente de la compactación, fragmenta o compartimenta en cierto modo el BF (II-Fig.2). Mientras que en el caso del monoespecie de *Pf* el BF cubre de forma bastante homogénea el sustrato de adhesión, los mixtos ofrecen una imagen más heterogénea o parcheada (II Fig. 2).

1.4 EL FRÍO

Según el Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA) y otras autoridades sanitarias, la capacidad de *Lm* de crecer a temperaturas de refrigeración es probablemente el factor que más contribuye a la transmisión de la listeriosis humana (Chan y Wiedmann, 2009). A 4°C el estrés por frío, a través de factores sigma y varias proteínas *CSP* modifica considerablemente el fenotipo de ambas especies (Chan y Wiedmann, 2009; Durack y col., 2013; Jaspe y col., 1995; Regeard y col., 2001) afectando a los mecanismos de división celular, transcripción y traducción, debido a los cambios en estructura secundaria de los ácidos nucleicos y las proteínas. También se modifican las membranas, fluidificándose los lípidos y aumenta la capacidad de captación de osmolitos como la carnitina (abundante en carnes) o la glicil betaína, lo que también forma parte de la adaptación a la hiperosmolaridad. Así pues, un BF formado en frío estaría más preparado para la desecación, particularmente si se ha desarrollado en una planta de productos cárnicos donde los osmolitos son abundantes.

De particular relevancia para la formación de BF es la disminución, por el frío, de la expresión de algunas proteínas de la superficie celular (Hemery y col., 2007) y en *Lm*, de los flagelos y otros apéndices de movilidad (Di Bonaventura y col., 2008) que intervienen en los primeros estadios de la adhesión. La información sobre desarrollo de BF en frío no es sin embargo abundante, tratando en su mayor parte de diferencias de aptitud entre cepas, bien de *Lm* (Kadam y col., 2013) o de *Pseudomonadaceas* de zonas árticas, donde se encuentran cepas psicrófilas, no solo psicrótrofas (Jeong y col., 2014).

Por lo que se refiere a las diferencias entre cepas en cuanto a capacidad de adaptación al frío, recientemente se ha analizado el exoproteoma de una colección de 23 cepas de *Lm* de origen alimentario, incluyendo persistentes y esporádicas, encontrándose mejor adaptación al frío (en ese caso 11°C) en las primeras (Cabrita y al, 2015). En concreto, el factor sigma B se expresó en mayor cantidad en las cepas persistentes. Este factor, modulador de la respuesta adaptativa frente al estrés por frío y el estrés oxidativo, favorece además protecciones cruzadas (Ferreira y col., 2001; Fraser y col., 2003; Moorhead y Dykes, 2004). Ochiai y col. (2014), también han encontrado que la capacidad para formar BF de las cepas persistentes está influida por la temperatura.

Los efectos de bajar la temperatura de 20 a 4°C estudiados para *Lm* en esta tesis, tanto sobre células planctónicas, como adheridas, fueron llamativos. *Lm*, a pesar de que puede proliferar incluso a -0,1°C, crece en suspensión más lentamente que *Pf*, a cualquier temperatura. Mayor diferencia aún existe entre sus respectivas velocidades de formación de BF (I-Fig. 1; II-Table 1). La estructura de los BF monoespecie de ambas bacterias, también cambia con la refrigeración (I-Fig. 3; II-Fig. 2). Con el frío, las células de *Lm* aparecen más desperdigadas sobre las superficies que a 20°C y en el caso de *Pf*, hay más matriz accesible en la superficie del BF. La falta de flagelos de *Lm* a 4°C es muy probablemente la causa del distinto patrón de formación de microcolonias y de cobertura de las superficies (I-Fig. 3). El tipo de producción y distribución de EPS parece ser un aspecto del estrés por frío desligado de lo anterior.

En el caso de los BF binarios, la estimulación de la población adherida de *Lm* gracias a *Pf*, resultó ser mayor a 4 que a 20°C (I-Fig.1 y 2). Quizás precisamente porque en frío *Lm* tiene más dificultades para la formación independiente de BF, es más apreciable la “ayuda” de *Pf*. También la compactación, consecuencia de la interacción entre especies y ya reseñada anteriormente, es más intensa a 4°C (II-Table 2). Cuando se midió la biomasa de los BF mixtos desarrollados a 20°C y a 4°C por *Pf* y *Lm* Scott A mediante densitometría, se observó que pese a ser la densidad celular comparable a ambas temperaturas, la biomasa de los BF desarrollados a 4°C era menor (I-Fig. 2). Esto parece indicar que el frío modula un cambio en la matriz.

1.5 EL ENVEJECIMIENTO

En las instalaciones de la industria alimentaria hay aspectos ambientales cambiantes y de efecto acumulativo que influyen en la estructura y la matriz de los BF. Entre otros factores, la microbiota compleja, la oscilación térmica entre los periodos de procesado de alimentos y las pausas para limpieza y desinfección, así como su frecuente ineficacia, tienen el riesgo de prolongar la edad de los BF reales. Por ello se decidió profundizar más en los efectos del envejecimiento sobre los BF, un tema que a pesar de su interés para la industria alimentaria, está bastante inexplorado en la literatura. La comparación entre las fases de crecimiento de un BF y las de una población de células planctónicas

tiene su dificultad, porque en los BF, la fase de latencia corresponde al cambio de fenotipo de planctónico a adherido y porque, aparte de la división celular, intervienen unas tasas muy variables de fijación y de desprendimiento, según las condiciones del cultivo.

Con todo, aquí comparamos BF “maduros” y “viejos” a las 2 temperaturas (II-Fig.2; II-Tabla 2). Los BF que llamamos maduros están próximos a alcanzar la máxima densidad celular en estos cultivos en batch, algo que sería comparable (con matices) al final de la fase exponencial. Los que llamamos viejos han entrado ya en la fase de dispersión, algo relativamente comparable a la fase estacionaria, con la diferencia de que la disminución de viables corresponde en buena parte al desprendimiento.

Pues bien, ese envejecimiento, o el paso entre esos 2 estadios, se tradujo aquí por una parte, en cambios de biovolumen, (cuantificado por análisis de imagen de CLSM, aquí matriz + células, viables o no) que eran positivos a 20°C y negativos a 4°C (II-Tabla 2; II-Fig. 2). A 20°C la ganancia en biovolumen parece corresponderse con un aumento de la proporción de matriz, que se ve en la superficie del BF cubriendo como una manta a las células (II-Fig. 2) aunque no puede excluirse la posibilidad de un aumento simultáneo de células no viables. La matriz ahí tiene una distribución espacial particularmente protectora, tanto en los BF de solo *Pf* como en los binarios *Pf/Lm*. Tiene pues sentido que los BF viejos sean particularmente inaccesibles o resistentes a los agentes antimicrobianos y sería de esperar que un tratamiento que desgaste, desgarré o disgregue esa “manta” mejorase considerablemente la eficacia de dichos agentes. A 4°C el biovolumen se reduce con el envejecimiento y no se observa esa capa de matriz cubriendo las células.

Por otra parte, el envejecimiento conlleva pérdidas de células viables muy distintas según la temperatura, el miembro del consorcio (*Pf* o *Lm*) y la cepa de *Lm*. En los BF puros, *Pf* pierde más viables a 20°C que a 4°C (2 log vs. menos de 1 log) (II-Tabla 1). En los mixtos, *Pf* pierde aproximadamente 1 log al envejecer, independientemente de la temperatura o la cepa de *Lm*. Las viables de *Lm*, sin embargo, también pierden como 1 log a 20°C, pero a 4°C, aumentan. Es muy probable que su ubicación en la parte inferior, más protegida, de los BF sea la causa de ese aumento de *Lm* en los BF viejos obtenidos a bajas temperaturas. Otros autores han descrito también la asociación entre edad de los BF y resistencia a distintas condiciones de estrés (Lee y col., 2014; Serra y Hengge, 2014).

2 CONTROL CON QUITOSANO DE LOS BIOFILMS SIMULADOS

2.1 EMPLEO DEL QUITOSANO SOBRE BIOFILMS

Muchos desinfectantes tal como son usados en la industria alimentaria, son ineficaces frente a los BF. El desarrollo de alternativas que sustituyan y/o complementen su uso

tradicional en la industria alimentaria, se ha convertido pues en una necesidad (Cruz y col., 2014; Glinel y col., 2012; Sadekuzzaman y col., 2015; Srey y col., 2013). De entre ellas, una de las más sostenibles podría ser el quitosano, que es un compuesto natural y biodegradable. Sobre su inocuidad, cabe mencionar que forma parte de levaduras y setas comestibles. Está autorizado como película comestible para alimentos (Devlieghere y col., 2004). Legalmente tiene un *status* de compuesto GRAS en EEUU y de complemento alimentario en la Unión Europea, con una alegación aceptada como hipocolesterémico (EFSA, 2011).

La eficacia antimicrobiana del quitosano contra células en suspensión ha sido ampliamente probada (Dutta y col., 2012; Fernandes y col., 2008; Tsai y Su, 1999). Su efecto frente a los BF monoespecie ha sido previamente estudiado por este grupo (Orgaz y col., 2011 y 2013). En esta tesis, la cuantificación del efecto del quitosano sobre los BF mixtos *Pf/Lm* descritos en el apartado de simulación, se comenta más adelante.

El mecanismo de acción del quitosano no está aún bien establecido, aunque se acepta que es inespecífico y localizado preferentemente en lesiones de membrana. En esta tesis se han visualizado, por CLSM, daños estructurales provocados en los BF por el quitosano. Se trata de perforaciones o brechas en la matriz, con ciertos engrosamientos en sus bordes, que podrían derivarse del desplazamiento y aglutinamiento de grandes porciones de biomasa (III-Fig. 3; IV-Fig. 2, 3, 4). Se conoce que el quitosano tiene acción emulsionante (Elsabee y col., 2009) pero no el papel de los lípidos en las uniones que sostienen el gel de la matriz. Quizás como policación podría alterar la red de polisacáridos ácidos, proteínas y eDNA existente en la matriz (Das y col., 2013). En cuanto a los polisacáridos ácidos, se ha descrito la capacidad del quitosano para formar poros en las paredes vegetales (Young y col., 1982).

En cuanto al eDNA, los últimos resultados sobre su papel en la estabilización de la matriz de los BF (Jakubovics y col., 2013; Okshevsky y Meyer, 2015) y en concreto en la de *Lm* (Guilbaud y col., 2015; Harmsen y col., 2010) sugieren la posibilidad de una interacción quitosano/eDNA como posible causa de las perforaciones encontradas. Kaplan y col. (2012), por otra parte, han descrito lesiones en la estructura de BF causadas por DNAasa, que aumentan la susceptibilidad de las células frente a antibióticos.

Por otra parte, conviene recordar que las soluciones de quitosano en ácido pueden contener partículas de cierto tamaño, mal dispersadas, además de ser muy viscosas. Ambos aspectos pueden tener alguna relación con el carácter muy focalizado de las lesiones causadas. Por un lado, los agregados de cierto tamaño causarían daños considerables en pocos puntos. Por otra parte, la viscosidad limitaría la difusión a través de la matriz, lo que probablemente mejoraría al disminuir su peso molecular. De hecho, se ha obtenido una mayor actividad antiBF con los productos de degradación enzimática

del quitosano (Orgaz y col., 2011). El quitosano, por otra parte, es susceptible de ser degradado enzimáticamente por enzimas cuya presencia ha sido detectada en la matriz, tales como las proteasas producidas por *Pf* (Flemming y Wingender, 2010; Kumar y col., 2004; Orgaz y col., 2007; Raafat y col., 2008) o las quitinasas producidas por *Lm* (Chaudhuri y col., 2013; Frederiksen y col., 2013; Paspaliari y col., 2014). La diferente capacidad de unas cepas y otras para producir este tipo de enzimas podría explicar diferencias encontradas, en cuanto a la eficacia del quitosano, entre las cepas evaluadas.

La capacidad del quitosano para “abrir” la estructura de los BF pudiera ser el fundamento de su eficacia en combinación con otros agentes antimicrobianos y procesos higienizantes (Azadi y col., 2012; Tsai y col., 2011; Zhang y col., 2013).

2.2 EFECTO DE LA INTERACCIÓN ENTRE ESPECIES SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD

De manera general, la presencia de *Pf* en los BF desarrollados a 20°C favoreció la resistencia de *Lm* al tratamiento con quitosano (III-Fig. 1). Otros autores han descrito un fenómeno similar exponiendo BF multiespecie a otros biocidas (Behnke y col., 2011; Simões y col., 2009; van der Veen y Abee, 2011). En nuestro caso, no se percibieron diferencias en función de la persistencia y la cepa de referencia tuvo un comportamiento comparable a las demás *Lm*.

Sin embargo, cuando los BF fueron desarrollados en condiciones de estrés por frío, como se comenta más adelante, los resultados del quitosano variaron (III-Fig. 2). Las cepas persistentes tendieron a ser menos tolerantes al quitosano en los BF mixtos formados a 4°C. Las cepas no persistentes, tuvieron un comportamiento variable, mientras que la cepa de referencia sí que se benefició de la presencia de *Pf*.

Diversos autores han encontrado variabilidad en la respuesta de distintas cepas de *Lm* a tratamientos antimicrobianos (Heir y col., 2004). Los mecanismos que podrían estar implicados en la mayor tolerancia a biocidas de los BF multiespecie han sido revisados recientemente (Sanchez-Vizueté y col., 2015). Parece que la interacción entre las especies integrantes es en buena parte responsable de las ventajas que se consiguen en los consorcios. En otras palabras, la variabilidad estaría en función de las peculiaridades de la compatibilidad de cada cepa con su acompañante.

El patrón de distribución espacial observado mediante la tinción diferencial Gram positivas/Gram negativas en uno de los trabajos que componen esta tesis (I-Fig. 4, 5 y 6) podría contribuir a explicar la protección de las células de *Lm* en los BF mixtos (Leriche y col., 2003). Dado que *Lm* tiende a localizarse en las capas más profundas de las microcolonias, como la difusión en esos estratos es escasa, es probable que se reduzca la llegada allí del antimicrobiano. Por otro lado, en esas localizaciones, con menor concentración de oxígeno y de nutrientes, las células pueden experimentar reducidas

tasas de crecimiento y cambios fenotípicos (Schluter y col., 2014; Serra y col., 2013; Serra y Hengge, 2014) que podrían afectar a la interacción entre especies (Sabev y col., 2006) e indirectamente, a la susceptibilidad a este u otros antimicrobianos.

2.3 EFECTO DEL FRÍO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD

Tanto en los BF puros como en los mixtos, la tolerancia de *Lm* a quitosano aumentó cuando los BF se desarrollaron en frío (III-Fig. 1 y 2). La protección no quedó limitada a la viabilidad de las células adheridas. Cuando se estudiaron las lesiones causadas por el quitosano sobre la estructura de BF mixtos de la cepa 10p de *Lm* y *Pf*, se comprobó que estas fueron más drásticas en los BF desarrollados a temperatura ambiente (IV-Fig. 3). Lourenço y col. (2011), encontraron también células de *Lm* protegidas en BF formados en presencia de *P. aeruginosa*, siendo mayor la protección cuando los BF se desarrollaron a 12°C que a 37°C. Los autores sugieren que la naturaleza y cantidad de EPS podría ser el motivo de los resultados hallados. Nuestros datos sugieren, más o menos en la misma línea, que las bajas temperaturas inducen la compactación de la estructura del BF, posiblemente relacionada con la composición de la matriz.

De hecho, cuando se analizaron mediante CLSM las muestras control, se observaron estructuras bien diferentes en función de la temperatura (III-Fig. 3). Los BF mixtos desarrollados a 20°C y utilizados como diana para la exposición al quitosano, eran, en general, gruesos, voluminosos y con una ocupación uniforme de la superficie. Por el contrario, las regiones observadas de los correspondientes BF desarrollados a 4°C, mostraron un menor espesor y una cobertura heterogénea de la superficie a modo de parches.

Llama pues la atención que esos BF fríos fueran menos susceptibles a la acción del quitosano, lo que podría atribuirse a la compactación ya mencionada de la matriz, que limitaría la permeabilidad al quitosano. Además, es posible que el contenido o la accesibilidad del eDNA se reduzca con el tiempo de desarrollo de los BF que, en nuestras condiciones, es muy prolongado a 4°C (20 días).

2.4 RECUPERACIÓN DE LA ACCIÓN DEL QUITOSANO SOBRE *L. monocytogenes* EN BIOFILMS

Una vez finalizados los ciclos de limpieza y desinfección, de cualquier tipo, las células residuales que solo han resultado dañadas subletalmente, al reencontrarse en condiciones favorables, se recuperan y comienzan a dividirse de nuevo. Nos propusimos pues evaluar la capacidad de recuperación de los daños por quitosano sobre las células de *Lm* alojadas en los BF mixtos con *Pf*. Para este trabajo se emplearon 3 cepas de *Lm*: una persistente, 10p; una esporádica, 6np, y la Scott A. La elección de las dos primeras se basó en su comportamiento sobresaliente pero representativo de sus respectivos

grupos. La cepa 10p, en concreto, era la más tolerante al quitosano (III-Fig. 1 y 2), mientras que la cepa 6np era la más sensible (III-Fig.1).

En los BF puros formados a 20°C, tratados con quitosano y sometidos a 24h de revitalización, el número de células de *Lm* adheridas recuperó los niveles control (IV-Tabla 2). La presencia de *Pf* no modificó la velocidad aparente de recuperación (*Recovery Rate*, RR) de la cepa 10p de *Lm* en BF mixtos, pero aceleró la recuperación de las cepas Scott A y 6np.

Por el contrario, cuando los BF se desarrollaron a 4°C, la capacidad de recuperación de *Lm* empeoró. La cepa 6np en los BF puros no mostró crecimiento en placa hasta después de las 24h de revitalización. La presencia de *Pf* resultó ser imprescindible para la recuperación de *Lm* 6np en los BF desarrollados a 4°C (IV-Tabla 3).

En el apartado de simulación se comentaba que, sobre todo en BF fríos, las cifras de *Lm* viables de las cepas no persistentes en BF mixtos, eran inferiores a las presentes en BF monoespecie (III-Tabla 2); a esto nos referíamos allí como “cierto grado de incompatibilidad” entre ambas especies. Al tratar con quitosano, hemos observado que precisamente una de las cepas no persistentes, la 6np, es muy dependiente de *Pf* para recuperarse de los daños. Parece pues que el perjuicio para *Lm* en términos de viables, causado por *Pf* en los BF mixtos fríos, tendría la contrapartida de un beneficio a la hora de recuperarse del daño por quitosano. Y que esto tendría lugar gracias a la compactación, un efecto tanto de la interacción entre especies, como del estrés por frío.

Nos planteamos en último lugar averiguar cómo se recuperaban los daños estructurales causados por quitosano en los BF. Para ello, se visualizaron por CLSM los BF formados por *Pf* y la cepa de *Lm* 10p. Como ya se comentó anteriormente, las cifras de esta cepa en BF eran poco afectadas por factores externos y baja temperatura. Para medir la evolución del biovolumen ocupado por la población viva (marcada en verde) y muerta o dañada (marcada en rojo) a lo largo de la etapa de recuperación (IV-Fig. 2), se empleó un kit comercial que utiliza 2 fluorocromos, el syto (verde) que marca toda la población celular y el ioduro de propidio (rojo), que sólo penetra en las células con la membrana alterada (es decir, muertas o severamente dañadas). Tras el tratamiento, el biovolumen ocupado por la población viva descendió bruscamente en BF templados y fríos, siendo superior el descenso en estos últimos. Conforme avanzó la recuperación, el biovolumen ocupado por la población viva aumentó rápidamente en los BF templados (a las 5h prácticamente se había recuperado un 50% de la población) y más lentamente en los BF fríos. La cifra final de población viva en el biovolumen llega a ser, sin embargo, algo superior en los BF fríos.

Varios son los mecanismos que podrían estar implicados en la recuperación de las células tras el tratamiento con quitosano: la multiplicación de las células supervivientes

al tratamiento; la recuperación de las células dañadas subletalmente por el tratamiento (Trevors, 2011); y la resucitación de las células dormidas o persistoras (Lennon y Jones, 2011). La diferente contribución de cada uno de estos 3 mecanismos en función de la temperatura de desarrollo de los BF, podría explicar las diferencias encontradas en este trabajo.

Teniendo en cuenta la velocidad de recuperación de viables y la cuantificación de viables/no viables por CLSM, en los BF templados, los mecanismos aparentemente con más peso son los dos primeros (la multiplicación de supervivientes y la recuperación de las células que tienen daños subletales -la inmensa mayoría-). En los perfiles transversales de estos BF durante su recuperación, se podían ver pequeños núcleos verdes de células supervivientes, entre masas de células rojas, muertas o dañadas. Estos núcleos, aumentaron en número y tamaño conforme avanzaba la recuperación, de manera que tras 48h la masa inicialmente roja, muerta, era verde, viva y estaba bordeada por una corteza externa de células rojas (IV-Fig. 4). Por eso, al pasarse a medio fresco la recuperación era rápida.

En los BF fríos, posiblemente tenga más peso el tercer mecanismo, es decir, la resucitación de células persistoras. Existe cierta proporción de células durmientes o persistoras en los BF estresados por el frío (Lewis, 2010; Wang y Wood, 2011). El despertar de las células durmientes, posiblemente necesite más tiempo, lo que explicaría la recuperación más lenta observada en los BF fríos. Como dicen Lennon y Jones (2011) las células persistoras suponen un “*seed bank*”, es decir, un almacén de semillas que podrían repoblar de nuevo el BF.

En conjunto, se han simulado en esta tesis, en modelos simplificados, lo que pueden implicar para las características de los BF conteniendo *Lm*, distintas condiciones de temperatura, higiene e interacciones entre microorganismos de la microbiota esporádica o residente en industrias alimentarias. La interacción entre *Pf* y *Lm* en BF da lugar en general a una mayor fijación de *Lm* a superficies, a una distribución estratificada con *Lm* en capas profundas y también a una compactación de la matriz. El estrés por frío que tiene lugar a 4°C induce por otra parte variaciones considerables en la interacción entre ambas especies y en la propia estructura de los BF. Se han observado por otra parte comportamientos diversos entre las cepas de *Lm*, que podrían estar asociados a su aptitud para la persistencia en las instalaciones de procesado. El tratamiento con quitosano ha permitido por otra parte determinar diferencias cuali- y cuantitativas de la eficacia antilisteria, al emplear como diana los diversos tipos de BF obtenidos en la simulación.

CONCLUSIONES

Primera:

El número de células de *L. monocytogenes* que se incorpora a biofilms con *P. fluorescens* aumenta o disminuye según la cepa. Mientras que sobre las cepas persistentes (aisladas repetidamente del mismo lugar durante meses o años) el efecto de *P. fluorescens* fue positivo o neutro, sobre las no persistentes fue negativo, especialmente cuando los biofilms se desarrollaron a 4°C. Los biofilms mixtos tienden a una distribución espacial estratificada, con *L. monocytogenes* en las capas inferiores, que no es dependiente de la temperatura, ni la edad de los biofilms. Las diferencias encontradas entre cepas, no tuvieron relación con su serotipo o linaje.

Segunda:

La interacción entre *L. monocytogenes* y *P. fluorescens*, las bajas temperaturas de incubación y la edad de los biofilms, supusieron una compactación de su estructura, con una reducción tanto del volumen ocupado por la biomasa, como del espesor máximo y un cambio en el patrón de ocupación de la superficie del sustrato.

Tercera:

Los biofilms mixtos de *P. fluorescens*/*L. monocytogenes* pierden, por el envejecimiento, menos células viables que los monoespecie. Cuando los biofilms viejos se han desarrollado en frío, el número de *L. monocytogenes* viables se mantiene o aumenta. Cuando se han desarrollado a 20°C, solo se observa matriz en la superficie de los biofilms. Los cambios observados por efecto de la edad aumentan presumiblemente la tolerancia a los agentes antimicrobianos.

Cuarta:

La compactación antes citada hizo disminuir la susceptibilidad al quitosano de las células de *L. monocytogenes* en los biofilms. La presencia de *P. fluorescens* y las bajas temperaturas durante la formación de los biofilms, favorecieron pues la tolerancia. Inmediatamente después de la exposición a quitosano, la reducción logarítmica de células viables de Lm osciló entre 1 y 5, según el tipo de biofilm. El quitosano produce daños estructurales en los biofilms conteniendo *L. monocytogenes*, visibles como perforaciones o agujeros de hasta 100 µm o más de diámetro.

Quinta:

En los biofilms conteniendo *L. monocytogenes* y expuestos a quitosano, la población de células viables recuperó sus niveles iniciales tras 48h de revitalización en medio fresco a temperatura ambiente. La velocidad de recuperación fue mayor en presencia de *P. fluorescens* y menor cuando los biofilms se habían desarrollado en frío. La recuperación partía del interior de la biomasa.

Sexta:

La capacidad de *L. monocytogenes* para persistir en la industria alimentaria, parece responder a un balance entre factores intrínsecos y extrínsecos, siendo más importantes los primeros para las cepas persistentes y los segundos, para las esporádicas. Por ejemplo, las persistentes son en general más compatibles con *P. fluorescens* (no pierden viables cuando se asocian en biofilms) y más independientes de ella para la recuperación de daños por quitosano, mientras que las no persistentes son en principio menos compatibles, pero paradójicamente más dependientes de *P. fluorescens*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarnisalo, K., Sheen, S., Raaska, L., & Tamplin, M. (2007). Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of “gravad” salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 69–78. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.017>
- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., & Rorvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 57–63.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), 453–472. <http://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Adam, B., Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 51(4), 344–9. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-51-4-344>
- Adetunji, I. G. V., & TO. (2011). Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Klebsiella pneumoniae* on Catheter, Glass and Stainless-steel Surfaces. *Lobal VeterinarY*, 6(1), 6–10.
- Al-Bakri, A. G., Gilbert, P., & Allison, D. G. (2005). Influence of gentamicin and tobramycin on binary biofilm formation by co-cultures of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5), 392–6. <http://doi.org/10.1002/jobm.200510011>
- Allegrucci, M., & Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 2030–8. <http://doi.org/10.1128/JB.01369-06>
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1114–28. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2011). Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE*, 6(3), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014786>
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2011). Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE*, 6(3), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014786>
- Alpkvist, E., Alpkvista, E., & Klapper, I. (2007). A multidimensional multispecies continuum model for heterogeneous biofilm development. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69(2), 765–89. <http://doi.org/10.1007/s11538-006-9168-7>

- An, D., & Parsek, M. R. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Current Opinion in Microbiology*, 10(3), 292–6. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.011>
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., & Parsek, M. R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3828–33. <http://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Ando, T., Itakura, S., Uchii, K., Sobue, R., & Maeda, S. (2009). Horizontal transfer of non-conjugative plasmid in colony biofilm of *Escherichia coli* on food-based media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(10), 1865–1869. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-0070-y>
- Angelidis, A. S., Smith, L. T., Hoffman, L. M., & Smith, G. M. (2002). Identification of opuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2644–50.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 3, 826–834.
- Arguedas-Villa, C., Kovacevic, J., Allen, K. J., Stephan, R., & Tasara, T. (2014). Cold growth behaviour and genetic comparison of Canadian and Swiss *Listeria monocytogenes* strains associated with the food supply chain and human listeriosis cases. *Food Microbiology*, 40, 81–87. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.001>
- Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hébraud, M., & Héchard, Y. (2004). Global analysis of gene expression in an rpoN mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 5), 1581–90. <http://doi.org/10.1099/mic.0.26860-0>
- Azadi, G., Seward, M., Larsen, M. U., Shapley, N. C., & Tripathi, A. (2012). Improved Antimicrobial Potency through Synergistic Action of Chitosan Microparticles and Low Electric Field. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(3), 531–541. <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9794-5>
- Azizoglu, R. O., & Kathariou, S. (2010). Inactivation of a cold-induced putative rna helicase gene of *Listeria monocytogenes* is accompanied by failure to grow at low temperatures but does not affect freeze-thaw tolerance. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1474–9.
- Bagge-Ravn, D. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239–250. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00067-9](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00067-9)

- Bamford, C. V., d'Mello, A., Nobbs, A. H., Dutton, L. C., Vickerman, M. M., & Jenkinson, H. F. (2009). *Streptococcus gordonii* Modulates *Candida albicans* Biofilm Formation through Intergeneric Communication. *Infection and Immunity*, 77(9), 3696–3704. <http://doi.org/10.1128/IAI.00438-09>
- Banerjee, I., Pangule, R. C., & Kane, R. S. (2011). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.), 23(6), 690–718. <http://doi.org/10.1002/adma.201001215>
- Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125(2), 237–46. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.001>
- Bauer, W. D., & Robinson, J. B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 234–237. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00310-5](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00310-5)
- Bayles, D. O., Annous, B. a, & Wilkinson, B. J. (1996). Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1116–1119.
- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D., & Camper, A. K. (2011). Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.05514-11>
- Beisel, C. L., & Storz, G. (2010). Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 866–882. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00241.x>
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., & Vera, M. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology*, 165(9), 773–81. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.006>
- Berk, V., Fong, J. C. N., Dempsey, G. T., Develioglu, O. N., Zhuang, X., Liphardt, J., Chu, S. (2012). Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science*, 337(6091), 236–239. <http://doi.org/10.1126/science.1222981>
- Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., Cox, L. J., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1994). Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1359–63.
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., & Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*, 78(3), 036601. <http://doi.org/10.1088/0034-4885/78/3/036601>

- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sorensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., Hoiby, N. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*, 21(9), 466–474. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002>
- Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2012). Swimming cells promote a dynamic environment within biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 12848–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1210297109>
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16630–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0407460101>
- Borezee, E., Pellegrini, E., & Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infection and Immunity*, 68(12), 7069–77.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–42.
- Bos, R., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 179–230. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x>
- Boyd, A., & Chakrabarty, A. M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 162–8.
- Boyle, J. (2007). *Structure and Function of Biofilms* Edited by W. G. Characklis and P. A. Wilderer. John Wiley and Sons, Chichester, 1989. 387 pp. ISBN 0 471 92480 6. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 50(3), 436–436. <http://doi.org/10.1002/jctb.280500315>
- Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., Barra, D., Longhi, C., Valenti, P., & Chiancone, E. (1997). A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3259–65.
- Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 21, 5–11.
- Brackman, G., Celen, S., Hillaert, U., Van Calenbergh, S., Cos, P., Maes, L., Coenye, T. (2011). Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PloS One*, 6(1), e16084. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016084>
- Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains, 74(14), 4491–4497. <http://doi.org/10.1128/AEM.00255-08>

- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Fontaine-Aupart, M.-P. (2008). Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2135–43. <http://doi.org/10.1128/AEM.02304-07>
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017–1032. <http://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Bridier, A., Sanchez-vizuite, P., Guilbaud, M., Piard, J., & Naïtali, M. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167–178. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Bridier, A., Sanchez-Vizuite, P., Le Coq, D., Aymerich, S., Meylheuc, T., Maillard, J. Y., Briandet, R. (2012). Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from Biocide Action. *PLoS ONE*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044506>
- Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2163–2176. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>
- Brown, H. L., Reuter, M., Salt, L. J., Cross, K. L., Betts, R. P., & van Vliet, a. H. M. (2014). Chicken Juice Enhances Surface Attachment and Biofilm Formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7053–7060. <http://doi.org/10.1128/AEM.02614-14>
- Buchanan, R. L., & Bagi, L. K. (1999). Microbial competition : effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*, 523–529.
- Buchovec, I., Paskeviciute, E., & Luksiene, Z. (2010). Photosensitization-based inactivation of food pathogen *Listeria monocytogenes* in vitro and on the surface of packaging material. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 99(1), 9–14. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.01.007>
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. M., & Hamilton, M. A. (2007). Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 236–44. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.010>
- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sorensen, S. J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? *Trends in Microbiology*, 22(2), 84–91. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Burmolle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sorensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–23. <http://doi.org/10.1128/AEM.03022-05>

- Busalmen, J. ., Vázquez, M., & de Sánchez, S. . (2002). New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. *Electrochimica Acta*, 47(12), 1857–1865. [http://doi.org/10.1016/S0013-4686\(01\)00899-4](http://doi.org/10.1016/S0013-4686(01)00899-4)
- Busscher, H. (1987). Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Letters*, 46(2), 165–173. [http://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90062-0](http://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90062-0)
- Busscher, H. J., Engels, E., Dijkstra, R. J. B., & Van Der Mei, H. C. (2008). Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 116(5), 493–495. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00568.x>
- Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Wozniak, D. J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622–38. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>
- Cabeca, T. K., Pizzolitto, A. C., & Pizzolitto, E. L. (2008). Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food and Nutrition*, 17(2), 121-125.
- Cabrita, P., Trigo, M. J., Ferreira, R. B., & Brito, L. (2015). Differences in the Expression of Cold Stress–Related Genes and in the Swarming Motility Among Persistent and Sporadic Strains of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(7), 150514115601005. <http://doi.org/10.1089/fpd.2014.1918>
- Cairns, L. S., Marlow, V. L., Bissett, E., Ostrowski, A., & Stanley-Wall, N. R. (2013). A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 90(1), 6–21. <http://doi.org/10.1111/mmi.12342>
- Cappitelli, F., Polo, a., & Villa, F. (2014). Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. *Food Engineering Reviews*, 29–42. <http://doi.org/10.1007/s12393-014-9077-8>
- Carlson, R. P., Taffs, R., Davison, W. M., & Stewart, P. S. (2008). Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces, 19(8), 1035–1046.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 111–22. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.031>

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2014). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012, Annual Report. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Chai, L., Romero, D., Kayatekin, C., Akabayov, B., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Isolation, characterization, and aggregation of a structured bacterial matrix precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17559–68. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.453605>
- Chambers, J. R., & Sauer, K. (2013). Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 21(1), 39–49. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.008>
- Chan, A., Lam, G., Lee, G., Lowe, C., & Yip, V. (2004). Effects of Antibody Induced Localized Cell Crowding on Autoinducer-2 Levels in *Salmonella Typhimurium* LT2, 5(April), 29–36.
- Chan, Y. C., & Wiedmann, M. (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 237–253. <http://doi.org/10.1080/10408390701856272>
- Chan, Y. C., Raengpradub, S., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2007). Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6484–98. <http://doi.org/10.1128/AEM.00897-07>
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Hultgren, S. J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), 851–5. <http://doi.org/10.1126/science.1067484>
- Characklis, W. (1990). Microbial biofouling. (K. Characklis, WR, Marshall, Ed.). Wiley, New York: Biofilms.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16(8), 388–396. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.05.006>
- Chaudhuri, S., Gantner, B. N., Ye, R. D., Cianciotto, N. P., & Freitag, N. E. (2013). The *Listeria monocytogenes* ChiA chitinase enhances virulence through suppression of host innate immunity. *mBio*, 4(2), 1–9. <http://doi.org/10.1128/mBio.00617-12>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17477–500. <http://doi.org/10.3390/ijms140917477>

- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853–9. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.012>
- Chitlapilly Dass, S., Abu-Ghannam, N., Antony-Babu, S., & J. Cummins, E. (2010). Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. *Food Research International*, 43(5), 1529–1536. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.030>
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2006). A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT - Food Science and Technology*, 39(1), 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.10.006>
- Choi, Y., & Morgenroth, E. (2003). Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci. Technol.*, 47, 69–76.
- Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., & Vieira, M. J. (2012). Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PloS One*, 7(6), e40189. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>
- Coenye, T., Brackman, G., Rigole, P., De Witte, E., Honraet, K., Rossel, B., & Nelis, H. J. (2012). Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(5), 409–12. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.005>
- Cole, S. P., Harwood, J., Lee, R., She, R., & Guiney, D. G. (2004). Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 3124–32.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. L., & Parsek, M. R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001264. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. (2013). Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1120–1131. <http://doi.org/10.1111/jam.12127>
- Cordero, O. X., Ventouras, L.-A., DeLong, E. F., & Polz, M. F. (2012). Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20059–20064. <http://doi.org/10.1073/pnas.1213344109>

- Corpe, W. (1980). Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In M. G. Bitton, KC (Ed.), Adsorption of microorganisms to surfaces (pp. 105–44). New York: John Wiley & Sons.
- Costa, E. M., Silva, S., Tavaría, F. K., & Pintado, M. M. (2013). Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *Anaerobe*, 20, 27–31. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.002>
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–45. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cowan, S. E., Gilbert, E., Liepmann, D., & Keasling, J. D. (2000). Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4481–5.
- Cruz, C. D., Pitman, A. R., Harrow, S. a., Fletcher, G. C., Bridier, A., de Sanchez-Vizute, M. P., Foster, K. R. (2014). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Trends in Microbiology*, 23(4), 510–543. <http://doi.org/10.1038/nature14660>
- Da Silva Meira, Q. G., de Medeiros Barbosa, I., Alves Aguiar Athayde, A. J., de Siqueira-Júnior, J. P., & de Souza, E. L. (2012). Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*, 25(2), 469–475. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.030>
- Da Silva, P. M. B., Acosta, E. J. T. R., Pinto, L. de R., Graeff, M., Spolidorio, D. M. P., Almeida, R. S., & Porto, V. C. (2011). Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*, 54(6), e712–7. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.02005.x>
- Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3593–6.
- Daneshvar Alavi, H. E., & Truelstrup Hansen, L. (2013). Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling*, 29(10), 1253–68. <http://doi.org/10.1080/08927014.2013.835805>
- Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 778–86. <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>

- Dauphin, G., Ragimbeau, C., & Malle, P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 51–61.
- Davies, D. G., & Geesey, G. G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 860–7.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Igleski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5361), 295–8.
- Davison, W. M., Pitts, B., & Stewart, P. S. (2010). Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 2920–7. <http://doi.org/10.1128/AAC.01734-09>
- De Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., do Nascimento, J. A., Batista, N. N., & Piccoli, R. H. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology*, 234(5), 821–832. <http://doi.org/10.1007/s00217-012-1694-y>
- Defoirdt, T., Miyamoto, C. M., Wood, T. K., Meighen, E. A., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein *luxR*. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2486–95. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01367.x>
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703–714. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.008>
- Dewanti, R., & Wong, A. C. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147–64.
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, a., Conter, M., & Ianieri, a. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1552–1561. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
- Dominiak, D. M., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2011). Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environmental Microbiology*, 13(3), 710–21. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02375.x>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <http://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–93.
- Dosti, B., Guzel-Seydim, Z., & Greene, A. K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 19–24. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00176.x>
- Drescher, K., Nadell, C. D., Stone, H. A., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2014). Solutions to the public goods dilemma in bacterial biofilms. *Current Biology : CB*, 24(1), 50–5. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.030>
- Dreszer, C., Vrouwenvelder, J. S., Paulitsch-Fuchs, a. H., Zwijnenburg, a., Kruithof, J. C., & Flemming, H. C. (2013). Hydraulic resistance of biofilms. *Journal of Membrane Science*, 429, 436–447. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.11.030>
- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590–600. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Dueholm, M. S., Petersen, S. V, Sonderkær, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K. L., Otzen, D. E. (2010). Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 77(4), 1009–20. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07269.x>
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 92(1), 107–38. <http://doi.org/10.1002/path.1700920113>
- Dunne, M. W. (2002). Bacterial adhesion: seen any good bio- films lately? 15: *Clin Microbiol Rev*, 15, 155–166.
- Durack, J., Ross, T., & Bowman, J. P. (2013). Characterisation of the Transcriptomes of Genetically Diverse *Listeria monocytogenes* Exposed to Hyperosmotic and Low Temperature Conditions Reveal Global Stress-Adaptation Mechanisms. *PLoS ONE*, 8(9), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073603>
- Dusane, D. H., Nancharaiah, Y. V., Zinjarde, S. S., & Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 81(1), 242–8. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.013>
- Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P. K. (2012). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International* (Vol. 18). <http://doi.org/10.1177/1082013211399195>
- Ebrahimi, A., Hemati, M., Shabanpour, Z., Habibian Dehkordi, S., Bahadoran, S., Lotfalian, S., & Khubani, S. (2015). Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), e16058. <http://doi.org/10.5812/jjm.16058>

- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition Allergies. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction o. EFSA Journal, 9(6), 2214–2235. <http://doi.org/doi:10.2903/j.efsa.2011.2214>.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 162 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.
- Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiology Reviews, 36(5), 990–1004. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
- Ells, T. C., & Truelstrup Hansen, L. (2006). Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. International Journal of Food Microbiology, 111(1), 34–42. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.033>
- Elsabee, M. Z., Morsi, R. E., & Al-Sabagh, A. M. (2009). Surface active properties of chitosan and its derivatives. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 74(1), 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.021>
- Elsholz, A. K. W., Wacker, S. A., & Losick, R. (2014). Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. Genes & Development, 28(15), 1710–20. <http://doi.org/10.1101/gad.246397.114>
- Epstein, A. K., Pokroy, B., Seminara, A., & Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(3), 995–1000. <http://doi.org/10.1073/pnas.1011033108>
- Fernandes, J. C., Tavaría, F. K., Soares, J. C., Ramos, Ó. S., João Monteiro, M., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. Food Microbiology, 25(7), 922–928. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.003>
- Ferreira, A., O’Byrne, C. P., & Boor, K. J. (2001). Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 67(10), 4454–7.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. Journal of Food Protection, 77(1), 150–70. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>

- Flemming, H. (2011). Microbial Biofouling: Unsolved Problems, Insufficient Approaches, and Possible Solutions. In H. Flemming & et al. (Eds.), Springer series on Biofilms 5 (pp. 81–110). Berlin Heidelberg: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-19940-0>
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Publishing Group, 8(9), 623–633. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fong, J. C. N., & Yildiz, F. H. (2007). The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology, 189(6), 2319–30. <http://doi.org/10.1128/JB.01569-06>
- Fong, J. C. N., Karplus, K., Schoolnik, G. K., & Yildiz, F. H. (2006). Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology, 188(3), 1049–59. <http://doi.org/10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006>
- Fowler, D. M., Koulov, A. V, Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid-from bacteria to humans. Trends in Biochemical Sciences, 32(5), 217–24. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>
- Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. Journal of Food Protection (USA), 53, 550-554..
- Frank, J. F., Ehlers, J., & Wicker, L. (2003). Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. Food Protection Trends, 23, 654–663.
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. Frontiers in Microbiology, 2, 167. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>
- Fraser, K. R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K., & O’Byrne, C. P. (2003). Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is sigmaB dependent. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 2015–22.
- Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., Leisner, J. J. (2013). Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. Microbiology (Reading, England), 159(Pt 5), 833–47. <http://doi.org/10.1099/mic.0.051839-0>
- Friedman, L., & Kolter, R. (2003). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Molecular Microbiology, 51(3), 675–690. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>

- Friedman, L., & Kolter, R. (2004). Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4457–4465.
<http://doi.org/10.1128/JB.186.14.4457-4465.2004>
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737–1761.
- Gantner, S., Schmid, M., Dürr, C., Schuegger, R., Steidle, A., Hutzler, P., Dazzo, F. B. (2006). In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 188–94. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00037.x>
- Garmyn, D., Gal, L., Lemaitre, J.-P., Hartmann, A., & Piveteau, P. (2009). Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: A central role for the agr system. *Communicative & Integrative Biology*, 2(4), 371–4.
- Gaso-Soka, D., Kovac, S., & Josic, D. (2010). Application of Proteomics in Food Technology and Food Biotechnology : Process Development, Quality Control and Product Safety. *Food (Bio) Technology*, 48(3), 284–295.
- Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 704–17. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00156.x>
- Gerhardt, P. N., Tombras Smith, L., & Smith, G. M. (2000). Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2544–50.
- Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5238–46.
<http://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., & Nychas, G. J. (2013). Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLoS ONE*, 8(10), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Moretro, T., Langsrud, S., Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(August), 1–26. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Moretro, T., Nychas, G. J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 289–309. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>

- Gillis, R. J., White, K. G., Choi, K.-H., Wagner, V. E., Schweizer, H. P., & Iglewski, B. H. (2005). Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3858–67. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3858-3867.2005>
- Gilmore, M. S., & Haas, W. (2005). The selective advantage of microbial fratricide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8401–2. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503828102>
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M., & Jouenne, T. (2012). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1670–84. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>
- Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L. M., Whitchurch, C. B. (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), 11541–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218898110>
- González Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., & Wood, T. K. (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 188(1), 305–16. <http://doi.org/10.1128/JB.188.1.305-316.2006>
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.014>
- Graumann, P. L., & Marahiel, M. A. (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 203–9.
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Lauzon, H. L., Einarsson, H., Kristinsson, K. G., & Kristjánsson, M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 41–51. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.023>
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., & Briandet, R. (2015). Exploring the Diversity of *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819. <http://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., & Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 51–7. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.028>

- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Åsli, A. W., & Moretro, T. (2010). Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* 0157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4557–4559. <http://doi.org/10.1128/AEM.02707-09>
- Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S., & Nelson, D. R. (2007). Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19926–30. <http://doi.org/10.1073/pnas.0710150104>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. <http://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A. S., Rogers, M., Pratten, J., & Roberts, A. P. (2010). Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 345–9. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00661.x>
- Hansen, S. K., Haagensen, J. A. J., Gjermansen, M., Jorgensen, T. M., Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2007). Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4932–43. <http://doi.org/10.1128/JB.00041-07>
- Hardie, K. R., Cooksley, C., Green, A. D., & Winzer, K. (2003). Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 3), 715–28. <http://doi.org/10.1099/mic.0.25853-0>
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S., & Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2271–2279. <http://doi.org/10.1128/AEM.02361-09>
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3914–22. <http://doi.org/10.1128/AAC.00657-09>
- Harrison, J. J., Ceri, H., Roper, N. J., Badry, E. A., Sproule, K. M., & Turner, R. J. (2005). Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 10), 3181–95. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27794-0>
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–92. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.006>

- Hassan, A. N., Birt, D. M., & Frank, J. F. (2004). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of Food Protection*, 67(2), 322–7.
- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3710–3.
- Haussler, S., & Fuqua, C. (2013). Biofilms 2012: New discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2947–2958. <http://doi.org/10.1128/JB.00239-13>
- Hay, I. D., Ur Rehman, Z., Ghafoor, A., & Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 752–759. <http://doi.org/10.1002/jctb.2372>
- Heir, E., Lindstedt, B.-A., Røtterud, O.-J., Vardund, T., Kapperud, G., & Nesbakken, T. (2004). Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 85–96. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.014>
- Helander, I. ., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 235–244. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00609-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00609-2)
- Hemery, G., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.-N., Haras, D., & Orange, N. (2007). Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(1), 49–54. <http://doi.org/10.1007/s10295-006-0160-x>
- Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and pH Values. *Journal of Food Science*, 53(5), 1549–1562. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09321.x>
- Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988). Scanning Electron Microscopic Examination of *Yersinia enterocolitica* Attached to Stainless Steel at Selected Temperatures and pH values. *Journal of Food Protection*, 6, 436–508.
- Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, C. G. . (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 273–283. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00125-X](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00125-X)
- Hingston, P. A., Stea, E. C., Knochel, S., & Hansen, T. (2013). Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiology*, 36(1), 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.011>

- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1995). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9–18. [http://doi.org/10.1016/0956-7135\(95\)91449-U](http://doi.org/10.1016/0956-7135(95)91449-U)
- Houry, A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A., & Briandet, R. (2012). Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13088–93. <http://doi.org/10.1073/pnas.1200791109>
- Huffman, R., & Butts, J. (2008). Lessons learned in the meat industry: control of *Listeria* in RTE meat and poultry products. Retrieved September 27, 2015, from <http://www.meatami.com/ht/a/GetDocumentAction/i/42115>
- Huis in 't Veld, J. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18.
- Hunger, K., Beckering, C. L., Wiegeshoff, F., Graumann, P. L., & Marahiel, M. A. (2006). Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 240–8. <http://doi.org/10.1128/JB.188.1.240-248.2006>
- Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20632–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1217993109>
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., & Kato, J. (2007). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3183–8. <http://doi.org/10.1128/AEM.02233-06>
- Iversen, C., Lane, M., & Forsythe, S. J. (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 378–82. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01507.x>
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., & Kaplan, J. B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 470–6. <http://doi.org/10.1128/AEM.02073-07>
- Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2004). Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4466–75. <http://doi.org/10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004>
- Jacobs, C., Braun, P., & Hammer, P. (2011). Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3801–3810. <http://doi.org/10.3168/jds.2011-4318>

- Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2014). The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 990–1011. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12087>
- Jahid, I. K., Lee, N.-Y., Kim, A., & Ha, S.-D. (2013). Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239–47. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-321>
- Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., & Burgess, J. G. (2013). Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology*. <http://doi.org/10.1111/lam.12134>
- Jaradat, Z. W., Al Mousa, W., Elbetieha, A., Al Nabulsi, A., & Tall, B. D. (2014). *Cronobacter* spp. - Opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 8), 1023–1037. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.073742-0>
- Jaspe, A., Oviedo, P., Fernandez, L., Palacios, P., & Sanjose, C. (1995). Cooling Raw Milk: Change in the Spoilage Potential of Contaminating *Pseudomonas*. *Journal of Food Protection*, 58(8), 915–21.
- Jeon, Y. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71–76. [http://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00200-9](http://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00200-9)
- Jeong, H.-H., Jeong, S.-G., Park, A., Jang, S.-C., Hong, S. G., & Lee, C.-S. (2014). Effect of temperature on biofilm formation by Antarctic marine bacteria in a microfluidic device. *Analytical Biochemistry*, 446, 90–5. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.027>
- Jiang, W., Hou, Y., & Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 196–202.
- Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon Using Chitosan-Based Antimicrobial Coatings and Films. *Journal of Food Science*, 76(1), 22–26. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01925.x>
- Jones, H. C., Roth, I. L., & Sanders 3rd, W.M., W. M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 316–325.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259–64. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>

- Kaplan, J. B., LoVetri, K., Cardona, S. T., Madhyastha, S., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., & Izano, E. A. (2012). Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *The Journal of Antibiotics*, 65(2), 73–7. <http://doi.org/10.1038/ja.2011.113>
- Kaplan, J. B., Velliyagounder, K., Ragunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J. K.-M., & Ramasubbu, N. (2004). Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8213–20. <http://doi.org/10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004>
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 73(2), 310–47. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>
- Kastbjerg, V. G., & Gram, L. (2009). Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1667–81. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04134.x>
- Kavanaugh, J. S., Thoendel, M., & Horswill, A. R. (2007). A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 65(3), 780–98. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05830.x>
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(5), 969–77. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.007>
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K. (2004). Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. <http://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>
- Keto-Timonen, R., Tolvanen, R., Lundén, J., & Korkeala, H. (2007). An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1866–73.
- Kim, C., Hung, Y.-C., Brackett, R., & Frank, J. (2004). Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms by electrolyzed oxidizing water. *J Food Process Preserv*, 25, 91–100. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1129>
- Kim, W., Racimo, F., Schluter, J., Levy, S. B., & Foster, K. R. (2014). Importance of positioning for microbial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), E1639–47. <http://doi.org/10.1073/pnas.1323632111>

- Kin, S., Schilling, M. W., Kim, T., Smith, B. S., Silva, J. L., Campano, S. G., & Jackson, V. (2012). Effects of Potassium Lactate and Acetate on *Listeria monocytogenes* Inhibition, Physicochemical and Sensory Properties of Smoked Catfish Fillets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*.
- Kiran, M. D., Adikesavan, N. V., Cirioni, O., Giacometti, A., Silvestri, C., Scalise, G., Balaban, N. (2008). Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Molecular Pharmacology*, 73(5), 1578–86. <http://doi.org/10.1124/mol.107.044164>
- Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M., & Parsek, M. R. (2005). Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4809–21. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4809-4821.2005>
- Kives, J., Orgaz, B., & Sanjose, C. (2006). Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 52(2), 123–7. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.018>
- Klapper, I., Rupp, C. J., Cargo, R., Purvedorj, B., & Stoodley, P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3), 289–96. <http://doi.org/10.1002/bit.10376>
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, 50(1), 61–68. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x>
- Ko, R., Smith, L. T., & Smith, G. M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 426–31.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Krajewski, S. S., & Narberhaus, F. (2014). Temperature-driven differential gene expression by RNA thermosensors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(10), 978–988. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.006>
- Królasik, J., Zakowska, Z., Krepska, M., & Klimek, L. (2010). Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 59(4), 281–7.

- Kumar, a. B. V, Gowda, L. R., & Tharanathan, R. N. (2004). Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products. *European Journal of Biochemistry*, 271(4), 713–723. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03975.x>
- Kuusela, P., Moran, A. P., Vartio, T., & Kosunen, T. U. (1989). Interaction of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 993(2-3), 297–300.
- Kuznetsova, M. V, Maslennikova, I. L., Karpunina, T. I., Nesterova, L. Y., & Demakov, V. A. (2013). Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* in predominant biofilm or planktonic forms of existence in mixed culture with *Escherichia coli* in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(9), 604–10. <http://doi.org/10.1139/cjm-2013-0168>
- L Caly, D., Bellini, D., A Walsh, M., Maxwell Dow, J., & P Ryan, R. (2015). Targeting Cyclic di-GMP Signalling: A Strategy to Control Biofilm Formation? *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 12–24.
- Lagrange, F., Reiprich, W., & Hoffmann, M. (2004). CIP-cleaning and disinfection with ozone water. *Fleischwirtschaft*, 84(2), 112–114.
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E., & Holck, A. L. (2003). Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 283–290. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00039-8](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00039-8)
- Larsen, P., Nielsen, J. L., Dueholm, M. S., Wetzel, R., Otzen, D., & Nielsen, P. H. (2007). Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology*, 9(12), 3077–90. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01418.x>
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(2), 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Schukken, Y. H. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792–802. <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2717>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 510–543. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Leclercq, A., Wanegue, C., & Baylac, P. (2002). Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1631–8.

- Lee Wong, A. C. (1998). Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765–2770. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75834-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75834-5)
- Lee, H. Y., Chai, L. C., Pui, C. F., Mustafa, S., Cheah, Y. K., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2013). Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 at different incubation temperatures and concentrations of sodium chloride. *Brazilian Journal of Microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 44(1), 51–5. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000004>
- Lee, J., Jayaraman, A., & Wood, T. K. (2007). Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology*, 7(1), 42. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-7-42>
- Lee, J.-H., Park, J.-H., Kim, J.-A., Neupane, G. P., Cho, M. H., Lee, C.-S., & Lee, J. (2011). Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling*, 27(10), 1095–104. <http://doi.org/10.1080/08927014.2011.633704>
- Lee, J.-J., Lee, G., & Shin, J.-H. (2014). $\sigma(B)$ affects biofilm formation under the dual stress conditions imposed by adding salt and low temperature in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea), 52(10), 849–55. <http://doi.org/10.1007/s12275-014-4369-5>
- Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. a. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal*, 8(4), 894–907. <http://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
- Lellouche, J., Friedman, A., Gedanken, A., & Banin, E. (2012). Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5611–24. <http://doi.org/10.2147/IJN.S37075>
- Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418–24. <http://doi.org/10.1128/JB.01967-06>
- Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews. Microbiology*. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., & Faille, C. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421–431. <http://doi.org/10.1080/08927011003699535>
- Lerliche, V., & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 594–605.

- Leriche, V., Briandet, R., & Carpentier, B. (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, 5(1), 64–71.
- Leung, V., & Lévesque, C. M. (2012). A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of Bacteriology*, 194(9), 2265–74. <http://doi.org/10.1128/JB.06707-11>
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(2), 267–74.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–72. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Fu, G. Q., Wang, T. P., & Su, Z. X. (2010). Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 493–499. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.011>
- Li, Y.-H., Tang, N., Aspiras, M. B., Lau, P. C. Y., Lee, J. H., Ellen, R. P., & Cvitkovitch, D. G. (2002). A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2699–708.
- Liao, C. H., & Blackburn, C. de W. (2006b). *Pseudomonas* and related genera. In B. CW (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 213–286). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Lin, C., Tang, P., Zhang, W., Wang, Y., Zhang, B., Wang, H., & Zhang, L. (2011). Effect of superhydrophobic surface of titanium on *Staphylococcus aureus* adhesion. *Journal of Nanomaterials*, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/178921>
- Lin, M. H., Shu, J. C., Lin, L. P., Chong, K. Y., Cheng, Y. W., Du, J. F., & Liu, S.-T. (2015). Elucidating the crucial role of poly N-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. *PloS One*, 10(4), e0124216. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124216>
- Lindsay, D., Brözel, V. S., Mostert, J. F., & von Holy, A. (2002). Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 352–61.
- Lisle, J. T., Broadaway, S. C., Prescott, A. M., Pyle, B. H., Fricker, C., & McFeters, G. A. (1998). Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4658–62.

- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 147–155. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
- Liu, J., Prindle, A., Humphries, J., Gabalda-Sagarra, M., Asally, M., Lee, D. D., Süel, G. M. (2015). Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature14660>
- Loo, C. Y., Corliss, D. A., & Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1374–1382. <http://doi.org/10.1128/JB.182.5.1374-1382.2000>
- López-Gálvez, F., Gil, M. I., Truchado, P., Selma, M. V., & Allende, A. (2010). Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiology*, 27(2), 199–204. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.009>
- Lou, J., & Yousef, A. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E. T. Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and food safety* (pp. 131–224).
- Lourenço, A., Machado, H., & Brito, L. (2011). Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *Journal of Food Science*, 76(2), M143–8. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02011.x>
- Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11197–202. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704624104>
- Luksiene, Z., Buchovec, I., & Paskeviciute, E. (2010). Inactivation of several strains of *Listeria monocytogenes* attached to the surface of packaging material by Na-Chlorophyllin-based photosensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 101(3), 326–31. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.08.002>
- Lundén, J. M., Autio, T. J., Sjöberg, A. M., & Korkeala, H. J. (2003). Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2062–9.
- Lundén, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1204–7.
- Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2008). Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 276–80. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02305.x>

- Lungu, B., Ricke, S. C., & Johnson, M. G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, 15(1-2), 7–17. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.08.001>
- Lungu, B., Saldivar, J. C., Story, R., Ricke, S. C., & Johnson, M. G. (2010). The Combination of Energy-Dependent Internal Adaptation Mechanisms and External Factors Enables *Listeria monocytogenes* to Express a Strong Starvation Survival Response During Multiple-Nutrient Starvation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 499–505. <http://doi.org/10.1089/fpd.2009.0408>
- Luppens, S. B. I., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M. J., Wittink, F. R. A., Bruning, O., Crielaard, W. (2008). Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(3), 183–9. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00409.x>
- Mackey, B. (2000). Injured bacteria. In L. G.W., Gould; T. C., Baird-Parker; A.M. (Ed.), *The microbiological safety and quality of food* (pp. 315–341). Gaithersburg, MD.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection (USA)*.
- Mah, T.-F. (2012a). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–72. <http://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Mah, T.-F. (2012b). Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 4791–2. <http://doi.org/10.1128/JB.01187-12>
- Mai, T. L., & Conner, D. E. (2007). Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 282–286. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.006>
- Mangalappalli-Illathu, A. K., & Korber, D. R. (2006). Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3588–96. <http://doi.org/10.1128/AAC.00573-06>
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS One*, 4(6), e5822. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822>
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., & Briandet, R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*, 22(8), 1357–1362. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.012>

- Markkula, A., Mattila, M., Lindström, M., & Korkeala, H. (2012). Genes encoding putative DEAD-box RNA helicases in *Listeria monocytogenes* EGD-e are needed for growth and motility at 3°C. *Environmental Microbiology*, 14(8), 2223–32. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02761.x>
- Marshall, K. C. (1986). Adsorption and adhesion processes in microbial-growth at interfaces. *Advances In Colloid And Interface Science*, 25(1), 59–86. [http://doi.org/10.1016/0001-8686\(86\)80002-1](http://doi.org/10.1016/0001-8686(86)80002-1)
- Marshall, K. C., Stout, R., & Mitchell, R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68(3), 337–348. <http://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>
- Martinez, L. R., Mihu, M. R., Han, G., Frases, S., Cordero, R. J. B., Casadevall, A., Nosanchuk, J. D. (2010). The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials*, 31(4), 669–679. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.087>
- Matsukawa, M., & Greenberg, E. P. (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4449–56. <http://doi.org/10.1128/JB.186.14.4449-4456.2004>
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 3–16.
- McCarthy, Y., Yang, L., Twomey, K. B., Sass, A., Tolker-Nielsen, T., Mahenthiralingam, E., Ryan, R. P. (2010). A sensor kinase recognizing the cell-cell signal BDSF (cis-2-dodecenoic acid) regulates virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *Molecular Microbiology*, 77(5), 1220–36. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07285.x>
- McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., Mahon, B. E. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *The New England Journal of Medicine*, 369(10), 944–53. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1215837>
- McDougald, D., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2007). Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2), 445–53. <http://doi.org/10.1007/s00216-006-0761-2>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 39–50. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2695>

- McNab, R., Ford, S., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G., & Lamont, R. (2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 185, 274–284.
- Mellefont, L., McMeekin, T., & Ross, T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int. J. Food Microbiol*, 21, 157–168.
- Mena, C. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213–216. [http://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00057-1](http://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00057-1)
- Meyer, B., & Cookson, B. (2010). Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *The Journal of Hospital Infection*, 76(3), 200–5. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.05.020>
- Miettinen, M. K., Björkroth, K. J., & Korkeala, H. J. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 187–92.
- Miladi, H., Ammar, E., Ben Slama, R., Sakly, N., & Bakhrouf, A. (2013). Influence of freezing stress on morphological alteration and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*: Relationship with cell surface hydrophobicity and membrane fluidity. *Archives of Microbiology*, 195(11-10), 705–715. <http://doi.org/10.1007/s00203-013-0921-7>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165–99. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5848–54. <http://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>
- Mitri, S., & Foster, K. R. (2013). The genotypic view of social interactions in microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 47, 247–73. <http://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>
- Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 255–61.
- Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68(1), 92–7.
- Monds, R. D., & O'Toole, G. a. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>

- Moorhead, S. M., & Dykes, G. A. (2004). Influence of the *sigB* gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 63–72. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00332-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00332-5)
- Moretro, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107–121. <http://doi.org/10.1017/S1479050504001322>
- Morris, J. J. (2015). Black Queen evolution: the role of leakiness in structuring microbial communities. *Trends in Genetics*, 31(8), 475–82. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2015.05.004>
- Moscato, M., García, E., & López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7785–95. <http://doi.org/10.1128/JB.00673-06>
- Mullane, N., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P. G., & Fanning, S. (2008). Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5913–5917. <http://doi.org/10.1128/AEM.00745-08>
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., & Varaldo, P. E. (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 2019–23.
- Nadell, C. D., Foster, K. R., & Xavier, J. B. (2010). Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation. *PLoS Computational Biology*, 6(3), e1000716. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000716>
- Nebahat, B., Vatansever, L., Duman Aydin, B., Sezer, Ç., Güven, A., Gülmez, M., Kürkçüoğlu, M. (2010). Effect of oregano essential oil on biofilms formed by *Staphylococci* and *Escherichia coli*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(A), 23–29. <http://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1147>
- Nguyen, K. T., Piastro, K., Gray, T. A., & Derbyshire, K. M. (2010). Mycobacterial biofilms facilitate horizontal DNA transfer between strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5134–42. <http://doi.org/10.1128/JB.00650-10>
- Nickel, M., Homuth, G., Böhnisch, C., Mäder, U., & Schweder, T. (2004). Cold induction of the *Bacillus subtilis* bkd operon is mediated by increased mRNA stability. *Molecular Genetics and Genomics*: MGG, 272(1), 98–107. <http://doi.org/10.1007/s00438-004-1038-0>
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14–24. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.012>

- Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252–259.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>
- Nnous, B. A. A. A., Ratamico, P. I. N. A. M. F., & Mith, J. L. S. (2009). Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do, 74(1).
<http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01022.x>
- Norton, D. M., McCamey, M. A., Gall, K. L., Scarlett, J. M., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2001). Molecular Studies on the Ecology of *Listeria monocytogenes* in the Smoked Fish Processing Industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 198–205. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.1.198-205.2001>
- Norwood, D. E., & AGilmour. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*, 33(4), 320–324.
<http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01004.x>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
<http://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Ochiai, Y., Yamada, F., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., & Ueda, F. (2014). Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection*, 77(1), 133–40. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-074>
- Okshevsky, M., & Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 341–52.
<http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.841639>
- Okshevsky, M., Regina, V. R., & Meyer, R. L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73–80.
<http://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.002>
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 877–886.
<http://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>
- Olsson, I.-M., Johansson, E., Berntsson, M., Eriksson, L., Gottfries, J., & Wold, S. (2006). Rational DOE protocols for 96-well plates. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 83(1), 66–74. <http://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.01.005>
- Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., & Jose, C. S. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 817–828. <http://doi.org/10.3390/ijms12010817>

- Orgaz, B., Neufeld, R. J., & SanJose, C. (2007). Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1045–1051. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.003>
- Orgaz, B., Puga, C. H., Martínez-Suárez, J. V., & SanJose, C. (2013). Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control*, 32(2), 484–489. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.024>
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. N. V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10), 1177–84. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0535>
- Ostrowski, A., Mehert, A., Prescott, A., Kiley, T. B., & Stanley-Wall, N. R. (2011). YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4821–31. <http://doi.org/10.1128/JB.00223-11>
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Boistier, E., Blum, L. J., & Bonneau, M. (2000). The development of an ultrasonic apparatus for the noninvasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 47–52.
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., & Blum, L. J. (2003). “*Escherichia coli*-milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling*, 19(3), 159–68. <http://doi.org/10.1080/08927014.2003.10382978>
- Ozdemir, H. O., Buzoglu, H. D., Calt, S., Stabholz, A., & Steinberg, D. (2010). Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *Journal of Endodontics*, 36(5), 842–6. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.008>
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(9), 577–88. <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>
- Pammi, M., Liang, R., Hicks, J., Mistretta, T.-A., & Versalovic, J. (2013). Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, 13(1), 257. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-13-257>
- Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711–7717. <http://doi.org/10.1128/AEM.01065-06>

- Park, J., Jagasia, R., Kaufmann, G. F., Mathison, J. C., Ruiz, D. I., Moss, J. A., Janda, K. D. (2007). Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chemistry & Biology*, 14(10), 1119–27. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.08.013>
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4360–5.
- Paspaliari, D. K., Mollerup, M. S., Kallipolitis, B. H., Ingmer, H., & Larsen, M. H. (2014). Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* is positively regulated by the Agr system. *PLoS ONE*, 9(4), 1–8.0 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095385>
- Pereira, C. S., Thompson, J. A., & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 156–81. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x>
- Pérez Ibarreche, M., Castellano, P., & Vignolo, G. (2014). Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Science*, 96(1), 295–303. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.010>
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, a., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 131–144. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.08.003>
- Periasamy, S., Joo, H.-S., Duong, A. C., Bach, T.-H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1281–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Petersen, F. C., Pecharki, D., & Scheie, A. A. (2004). Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6327–31. <http://doi.org/10.1128/JB.186.18.6327-6331.2004>
- Petersen, F. C., Tao, L., & Scheie, A. A. (2005). DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4392–400. <http://doi.org/10.1128/JB.187.13.4392-4400.2005>
- Pham, T. K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P. C., & Stafford, G. P. (2010). A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics*, 10(17), 3130–41. <http://doi.org/10.1002/pmic.200900448>
- Phan-Thanh, L., & Gormon, T. (1995). Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 16(3), 444–50.

- Picioreanu, C., van Loosdrecht, M., & Heijnen, J. (2001). Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 205–218.
- Pieta, L., Garcia, F. B., Riboldi, G. P., de Oliveira, L. A., Frazzon, A. P. G., & Frazzon, J. (2014). Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1707–1714. <http://doi.org/10.1007/s13213-014-0814-2>
- Pimentel-Filho, N. de J., Martins, M. C. de F., Nogueira, G. B., Mantovani, H. C., & Vanetti, M. C. D. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004>
- Porsby, C. H., Vogel, B. F., Mohr, M., & Gram, L. (2008). Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 287–95. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.010>
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), 755–805.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P. (1999). Abiotic Surface Sensing and Biofilm-Dependent Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181(19), 5993–6002.
- Puga, C., SanJose, C., & Orgaz, B. (2014). Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms. In E. C. Hambrick (Ed.), *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies* (pp. 115–131). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., & Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 367–374. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., & Qu, D. (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 7), 2083–92. <http://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006031-0>
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 186–201. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Raafat, D., von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H.-G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764–73. <http://doi.org/10.1128/AEM.00453-08>

- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1908–13. <http://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>
- Regeard, C., érieau, A. M., & Guespin-Michel, J. F. (2001). A bioluminescence assay for screening thermoregulated genes in a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 183–189. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00952.x>
- Rendueles, O., & Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 972–89. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x>
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94–100.
- Rieu, A., Lemaître, J., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 76–82. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.006>
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2007). Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6125–33. <http://doi.org/10.1128/AEM.00608-07>
- Robbins, J. B., Fisher, C. W., Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, 68(3), 494–8.
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(12), 1441–50. <http://doi.org/10.1586/eri.10.106>
- Roberts, M. E., & Stewart, P. S. (2005). Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 1), 75–80. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27385-0>
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C., & Oliveira, R. (2006). Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 53(1), 105–12. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.009>
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2230–4. <http://doi.org/10.1073/pnas.0910560107>

- Rosenberg M; Kjelleberg S. H. (1986). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology*, 9, 353–93.
- Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750–63. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg422>
- Saá Ibusquiza, P., Herrera, J. J. R., Vázquez-Sánchez, D., & Cabo, M. L. (2012). Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control*, 25(1), 202–210. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.002>
- Sabev, H. A., Robson, G. D., & Handley, P. S. (2006). Influence of starvation, surface attachment and biofilm growth on the biocide susceptibility of the biodeteriogenic yeast *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 319–30. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03014.x>
- Saby, S., Leroy, P., & Block, J. C. (1999). *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5600–3.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491–509. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12144>
- Salas, B., Wiener, M., & Stoytcheva, M. (2012). Corrosion in the Food Industry and Its Control. *Methods and Equipment*, Dr. Benjamin Valdez (Ed.), ISBN: 978-953-307-905-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/corrosion-in-the-food-industry-and-its-control>
- Sanchez-Vizuite, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6(July), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
- Sapers, G. M. (2001). Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 305–311.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154. <http://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., & Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7312–26. <http://doi.org/10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004>

- Savard, T., Beaulieu, C., Boucher, I., & Champagne, C. P. (2002). Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *Journal of Food Protection*, 65(5), 828–33.
- Schirmer, B. C. T., Langsrud, S., Moretro, T., Hagtvedt, T., & Heir, E. (2012). Performance of two commercial rapid methods for sampling and detection of *Listeria* in small-scale cheese producing and salmon processing environments. *Journal of Microbiological Methods*, 91(2), 295–300. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.013>
- Schlisselberg, D. B., & Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35(1), 65–72. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.005>
- Schluter, J., & Foster, K. R. (2012). The evolution of mutualism in gut microbiota via host epithelial selection. *PLoS Biology*, 10(11), e1001424. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001424>
- Schluter, J., Nadell, C. D., Bassler, B. L., & Foster, K. R. (2014). Adhesion as a weapon in microbial competition, 9(1), 139–149. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.174>
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M. J., Stephan, R., & Tasara, T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1621–1627. <http://doi.org/10.1128/AEM.02154-08>
- Schmitt, J., & Flemming, H. (1999). Water binding in biofilms. *Water Science and Technology*, 39(7), 77–82. [http://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00153-5](http://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00153-5)
- Schopf, J., Hayes, J., & Walter, M. (1983). Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In J. Schopf (Ed.), *Earth's earliest biosphere* (pp. 361–384). New Jersey: Princeton University Press.
- Seper, A., Fengler, V. H. I., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Bishop, A. L., Schild, S. (2011). Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 82(4), 1015–37. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07867.x>
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1455–71. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio*, 4(2). <http://doi.org/10.1128/mBio.00103-13>
- Sharma, M; Anand, S. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry e a case. *Food Control*, 13(6-7), 469–477.

- Shaw, T., Winston, M., Rupp, C. J., Klapper, I., & Stoodley, P. (2004). Commonality of Elastic Relaxation Times in Biofilms. *Physical Review Letters*, 93(9), 098102. <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.098102>
- Shen, G., Rajan, R., Zhu, J., Bell, C. E., & Pei, D. (2006). Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(10), 3003–11. <http://doi.org/10.1021/jm060047g>
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>
- Shunmugaperumal, T. (2010). *Biofilm Eradication and Prevention*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/9780470640463>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43(1), 229–37. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.010>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants : evidence of resistance and recovery.
- Skillman, L. C., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of Applied Microbiology*, 85 Suppl 1, 13S–18S. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05278.x>
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*. <http://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Spoering, A. L., & Gilmore, M. S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 133–137. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.004>
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Steinberg, N., & Kolodkin-Gal, I. (2015). The Matrix Reloaded: How Sensing the Extracellular Matrix Synchronizes Bacterial Communities. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2092–2103. <http://doi.org/10.1128/JB.02516-14>
- Stewart, M. H., & Olson, B. H. (1992). Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2649–53.

- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 292(2), 107–13. <http://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
- Stewart, P. S. (2012). Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling*, 28(2), 187–98. <http://doi.org/10.1080/08927014.2012.662641>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–8.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199–210. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stocki, S. L., Annett, C. B., Sibley, C. D., McLaws, M., Checkley, S. L., Singh, N., White, A. P. (2007). Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is dependent on the belt type but not on the rdar morphotype. *Poultry Science*, 86(11), 2375–83. <http://doi.org/10.3382/ps.2007-00121>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A.-M., & Wirtanen, G. (1999). Hygiene of Gasket Materials Used in Food Processing Equipment Part 1. Food and Bioproducts Processing, 77(2), 137–145. <http://doi.org/10.1205/096030899532286>
- Strathmann, M., Mittenzwey, K.-H., Sinn, G., Papadakis, W., & Flemming, H.-C. (2013). Simultaneous monitoring of biofilm growth, microbial activity, and inorganic deposits on surfaces with an *in situ*, *online*, real-time, non-destructive, optical sensor. *Biofouling*, 29(5), 573–83. <http://doi.org/10.1080/08927014.2013.791287>
- Tasara, T., & Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1473–1484.
- Taylor, P., Valderrama, W. B., & Cutter, C. N. (2015). An Ecological Perspective of *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities An Ecological Perspective of *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food, (February), 37–41. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.561378>
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., & Hancock, L. E. (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 72(4), 1022–36. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06703.x>
- Tirumalai, P., & Prakash, S. (2011). Expression of chitinase and chitin binding proteins (CBP's) by *Listeria monocytogenes* J0161 in biofilm and Co-culture broths. *African Journal of Microbiology Research*, 5(29), 5188–93.

- Top, E. M., & Springael, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 262–9.
- Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L., & Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3135–3142. <http://doi.org/10.1128/AEM.02095-09>
- Trevors, J. T. (2011). Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 266–273. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.018>
- Tsai, G.-J., & Su, W.-H. (1999). Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62, 239–243.
- Tsai, T., Chien, H.-F., Wang, T.-H., Huang, C.-T., Ker, Y.-B., & Chen, C.-T. (2011). Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1883–90. <http://doi.org/10.1128/AAC.00550-10>
- Udine, C., Brackman, G., Bazzini, S., Buroni, S., Van Acker, H., Pasca, M. R., Coenye, T. (2013). Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems. *PloS One*, 8(1), e55112. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055112>
- Unión Europea. Reglamento (UE) n 1441/2007 de la Comisión, de 5 de Diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L 322*, 7 de Diciembre de 2007, pp. 12-29.
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 94–104. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.002>
- Valderrama, W. B., & Cutter, C. N. (2013). An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 801–17. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.561378>
- Valderrama, W. B., Ostiguy, N., & Cutter, C. N. (2014). Multivariate analysis reveals differences in biofilm formation capacity among *Listeria monocytogenes* lineages. *Biofouling*, 30(10), 1199–209. <http://doi.org/10.1080/08927014.2014.980818>

- Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 421–31. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.029>
- Van Schaik, E. J., Giltner, C. L., Audette, G. F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M., Irvin, R. T. (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1455–64. <http://doi.org/10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005>
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584–640. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 431–3. <http://doi.org/10.1038/nchembio.915>
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M., & Hardie, K. R. (2005). Making “sense” of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(5), 383–96. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1146>
- Verran, J., & Whitehead, K. (2005). Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *The International Journal of Artificial Organs*, 28(11), 1138–45.
- Villa, F., Giacomucci, L., Polo, A., Principi, P., Toniolo, L., Levi, M., Cappitelli, F. (2009). N-vanillylnonanamide tested as a non-toxic antifoulant, applied to surfaces in a polyurethane coating. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1407–13. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-0031-4>
- Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., & Tharanathan, R. N. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 391(Pt 2), 167–75. <http://doi.org/10.1042/BJ20050093>
- Visvalingam, J., & Holley, R. a. (2013). Adherence of cold-adapted *Escherichia coli* O157: H7 to stainless steel and glass surfaces. *Food Control*, 30(2), 575–579. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.010>
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Development*, 22(7), 945–53. <http://doi.org/10.1101/gad.1645008>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(3), 157–68. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2960>

- Walters, M., & Sperandio, V. (2006). Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 74(10), 5445–55. <http://doi.org/10.1128/IAI.00099-06>
- Wang, H., Zhang, X., Zhang, Q., Ye, K., Xu, X., & Zhou, G. (2015). Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. *Food Control*, 50, 574–580. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.049>
- Wang, R., Kalchayanand, N., Schmidt, J. W., & Harhay, D. M. (2013). Mixed biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *Journal of Food Protection*, 76(9), 1513–22. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-077>
- Wang, X., & Wood, T. K. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.05068-11>
- Wanner, O., & Gujer, W. (1986). A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(3), 314–28. <http://doi.org/10.1002/bit.260280304>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–46. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Weese, J. S., & Rousseau, J. (2006). Survival of *Salmonella* Copenhagen in food bowls following contamination with experimentally inoculated raw meat: effects of time, cleaning, and disinfection. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 47(9), 887–9.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Sleator, R. D., Wouters, J. A., Hill, C., & Abee, T. (2004). Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2912–8.
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1121–1138.
- West, S. a., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., & Griffin, A. S. (2007). The Social Lives of Microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 53–77. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740>
- Whitehead, K. a., & Verran, J. (2009). The effect of surface topography on the retention of microorganisms, (December), 253–259. <http://doi.org/10.1205/fbp06035>

- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., & Boor, K. J. (1998). General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 180(14), 3650–6.
- Wijman, J. G. E., de Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1481–8. <http://doi.org/10.1128/AEM.01781-06>
- Wolcott, R., Costerton, J. W., Raoult, D., & Cutler, S. J. (2013). The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(2), 107–12. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x>
- Wouters, J. A., Hain, T., Darji, A., Hüfner, E., Wemekamp-Kamphuis, H., Chakraborty, T., & Abee, T. (2005). Identification and characterization of Di- and tripeptide transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5771–8. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5771-5778.2005>
- Wu, H; Feng, GL; Li, XF, Liu, H. (2013). Application of proteomics in safety assessment and monitoring of food microorganisms. *Mod Food Sci Technol*, 29, 2793–2799.
- Yamakami, K., Tsumori, H., Sakurai, Y., Shimizu, Y., Nagatoshi, K., & Sonomoto, K. (2013). Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by *Streptococcus mutans*. *Pharmaceutical Biology*, 51(2), 267–70. <http://doi.org/10.3109/13880209.2012.717227>
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S., & Song, Z. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 74–81. <http://doi.org/10.4248/IJOS11027>
- Yebara, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75–104. <http://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Yildiz, F. H. (2008). Cyclic dimeric GMP signaling and regulation of surface-associated developmental programs. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 781–3. <http://doi.org/10.1128/JB.01852-07>
- Yoon, Y., & Sofos, J. N. (2008). Conditions affecting autoinducer-2-based quorum-sensing of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh beef. *Journal of Food Safety*, 28(4), 587–600. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00133.x>
- Young, D. H., Köhle, H., & Kaus, H. (1982). Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension-Cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris Cells. *Plant Physiology*, 70(5), 1449–54.

- Zhang, A., Mu, H., Zhang, W., Cui, G., Zhu, J., & Duan, J. (2013). Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. *Scientific Reports*, 3, 3364. <http://doi.org/10.1038/srep03364>
- Zhang, L.-H., & Dong, Y.-H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology*, 53(6), 1563–71. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>
- Zhang, Y., & Hu, Z. (2013). Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 286–95. <http://doi.org/10.1002/bit.24630>
- Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Wong, G. C. L. (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 497(7449), 388–91. <http://doi.org/10.1038/nature12155>
- Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Chen, D., Baker, D. A., Cords, B., & Doyle, M. P. (2013). Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, 76(4), 601–7. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-323>
- Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Schmidt, B. E., Baker, D. A., Cords, B., & Doyle, M. P. (2006). Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3314–20. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3314-3320.2006>
- Zhou, Y., Smith, D., Leong, B. J., Brännström, K., Almqvist, F., & Chapman, M. R. (2012). Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35092–103. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.383737>
- Zhu, K., Bayles, D. O., Xiong, A., Jayaswal, R. K., & Wilkinson, B. J. (2005). Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 2), 615–23. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27634-0>
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452–63.

APÉNDICES

1 LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Modelos de biofilm. Representación esquemática de 4 ejemplos típicos de biofilms que ocurren en la naturaleza y en entornos contruidos por el hombre. (Adaptado de Serra y Hengge, 2014).

Figura 2. Diferentes dimensiones de la matriz de EPS. (A) Esquema de un biofilm desarrollado sobre un sustrato sólido. Adhesión, maduración y dispersión; (B) Componentes mayoritarios de la matriz de un biofilm (polisacáridos, proteínas y eDNA). (C) Interacciones que estabilizan la matriz. Adaptado de Flemming y Wingender (2010).

Figura 3. Interacciones posibles entre el eDNA y otros componentes de la matriz de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Okshevsky, Regina y Meyer (2015).

Figura 4. Formación de biofilms y fenómenos relevantes durante el proceso. Adaptado de Breyers y Ratner (2004).

Figura 5. Imagen obtenida por CLSM de un biofilm de *Listeria monocytogenes* (en rosa), sobre un cupón de acero inoxidable 316. Las células se colocan en los surcos propios de la microestructura del material (barra = 20µm).

Figura 6. Mecanismos implicados en la resistencia frente a antimicrobianos en los biofilms. Adaptado de Abdallah y col. (2014).

Tabla 1. Funciones de la matriz de los biofilms. Adaptada de Flemming y Wingender (2010).

2 LISTADO DE ABREVIATURAS

agr: gen regulador accesorio

AFM: microscopía de fuerza atómica

AHL: homoserín lactonas-N-acetiladas

AI-1: autoinductor 1

AI-2: autoinductor 2

AI-3/epi/norepi: autoinductor 3/epinefrina/norepinefrina

AIP: péptidos autoinducidos

ALI: *Air-Liquid Interphase*

Bap: proteínas asociadas a superficies de biofilms

BF: biofilm

c-di-GMP: di guanilato cíclico

CDC: Centro para la Prevención y Control de Enfermedades

CIP: *Cleaning in Place*

CLSM: microscopía confocal láser de barrido

CSP: péptido señal de competencia

CSP: proteínas de choque térmico (*Cold Shock Proteins*)

CUAT: amonio cuaternario

DLVO: Derjaguin, Landau, Verwey y Over Beek

DspB: N-acetil-b-hexoaminidasa

ECM: matriz extracelular

eDNA: DNA extracelular

EFSA: Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria

EPS: sustancias poliméricas extracelulares

FI: *Fully Immersed*

FTIR-ATR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Attenuated Total Reflectance*

Lm: *Listeria monocytogenes*

NAG: N-acetilglucosamina

Pf: *Pseudomonas fluorescens*

PIA: polisacárido de adhesión intercelular

PNAG: poli-N-acetilglucosamina

QS: *quorum sensing*

RIP: péptido inhibidor de RNAIII

RMN: resonancia magnética nuclear

RR: *Recovery Rate*

RTE: listos para el consumo (*Ready To Eat*)

SAM: S-adenosilmetionina

SEM: microscopía electrónica

sRNA: ARN de bajo peso molecular

VPS: polisacárido de *Vibrio* spp.

3 LISTADO DE MICROORGANISMOS

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Agrobacterium tumefaciens

Bacillus subtilis

Campylobacter jejuni

Cronobacter sakazakii

Cryptococcus neoformans

Enterococcus faecalis

Escherichia coli

Gluconacetobacter xylinus

Helicobacter pylori

Lactobacillus sakei

Listeria monocytogenes

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas fluorescesns

Pseudomonas mirabilis

Pseudomonas putida

Salmonella enterica

Salmonella Thyphimurium

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus intermedius

Staphylococcus sciuri

Stenotrophomonas maltophilia

Streptococcus mutans

Tannerella forsythia

Thiobacillus ferrooxidans

Vibrio cholerae

Vibrio fischeri

Yersinia enterocolitica

